

ELAINE CRISTINA DA SILVA FANTINATTI

**RELAÇÕES GENÉTICAS DE POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762
DO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Mário A. Navarro da Silva

Co-orientador: Dra. Adriana Lacerda Twerdochlib

Curitiba

2009

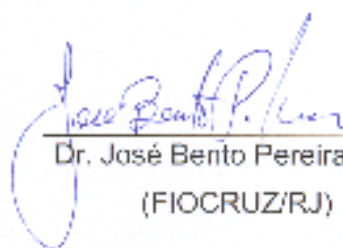
ELAINE CRISTINA DA SILVA FANTINATTI

"RELAÇÕES GENÉTICAS DE POPULAÇÕES DE *Aedes aegypti* Linnaeus,
1762 DO ESTADO DO PARANÁ"

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de "Mestre
em Ciências Biológicas", no Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal
do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva (Orientador)
(UFPR)



Dr. José Bento Pereira Lima
(FIOCRUZ/RJ)



Prof. Dr. Leonardo Magalhães Cruz
(UFPR)

Curitiba, 27 de março de 2009.

Às criaturas que, juntamente com Deus, me
concederam o direito à vida: meus pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todos os instantes de minha vida, não há palavras para agradecer.

À minha família, mãe, pai, irmão e sobrinha pela compreensão, apoio, amor. E especialmente à meus pais por sempre terem sido meu porto seguro ao longo de todo o trabalho e vida, em todos os momentos ao meu lado, auxiliando, incentivando. Amo vocês!

Ao meu orientador. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva e minha co-orientadora Dra. Adriana Lacerda Twerdochlib pela oportunidade de trabalho e orientação.

Aos meus colegas de curso e amigos: Alessandre, Anderson (o ser mais apavorado que já conheci), André, Caíto, Carolll (amiga querida companheira de ap), Danilo, Fernando, Gabrielzinho (amigo mais animado do ap, o cantor da casa), Netão, Marina (amiga querida de mil coisas), Thiago, Vanusa. Agradeço por todo incentivo, apoio e por todos os momentos de diversão.

À colega e amiga Cecília Kosmann pela companhia em laboratório, ajuda em diversas etapas e valiosas conversas sobre nossos trabalhos.

Aos colegas de laboratório, Ana Caroline, Betina, Carla, Daniel, Gisele, Jonny, Rodrigo, Sullamy.

À amiga e colega de laboratório Milehna M. Guarido pela convivência, cooperação em várias etapas do trabalho e preciosas conversas acerca de trabalho.

À Carla Cristina Dutra e Camila Meotti (Programa de Pós-graduação em Entomologia e Conservação da Biodiversidade – UFGD) pela agradável convivência durante período de intercâmbio na UFPR.

Aos meus amigos do tempo de graduação, em especial Edson, pelo apoio, conversas e por sempre me ouvir e à Carla (Gaúcha) por sempre estar me instigando a continuar.

À Paty Zilliotto (intrusa querida) pelo apoio e longas conversas na sacada, sobre o trabalho e a vida.

Ao doutorando André Luis da Costa da Silva (Universidade de São Paulo – ICB) pela disponibilidade e auxílio com o programa Arlequin.

Ao Msc. José Francisco de Oliveira Neto pelo auxílio com o programa TCS (Phylogenetic network estimation using statistical parsimony).

À Profa. Dra. Vera Margarete Scarpassa (INPA, Manaus) pela ajuda nas análises da Correção do Bonferroni.

A todos os pesquisadores, além dos já citados anteriormente, que me auxiliaram de alguma forma na construção deste trabalho, foram inúmeras pessoas que dispuseram de um pouco de seu tempo para auxiliar, meu muito obrigada.

À Secretaria de Saúde do Estado do Paraná (SESA), na pessoa do *Msc.* Alan Martins da Silva, pelo envio do material biológico que permitiu o desenvolvimento deste projeto.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e também para a minha formação profissional e humana durante estes dois anos meu muito obrigada!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	iii
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE SIGLAS	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUÇÃO	
1.1. Culicidae	1
1.2. <i>Aedes aegypti</i>	
1.2.1. Origem e dispersão	1
1.2.2. Características e biologia	3
1.2.3. Infecção por vírus	6
1.3. Dengue	7
1.4. DNA mitocondrial	12
1.5. Estudos genéticos em <i>Aedes aegypti</i>	13
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Obtenção dos espécimes	17
3.2. Localidades amostradas.....	19
3.3. Procedimentos em laboratório	
3.3.1. Extração de DNA.....	20
3.3.2. Reação de amplificação	20
3.3.3. Purificação dos produtos de PCR	23
3.3.4. Reações de sequenciamento	23
3.4. Análise das sequências	23
3.5. Análises de polimorfismo molecular	
3.5.1. Análise de diversidade genética.....	24
3.5.2. Testes de Neutralidade	24
3.5.3. Análise de Variância Molecular (AMOVA).....	25

3.5.4. Estruturação das Populações.....	25
3.5.5. Isolamento por distância	25
3.5.6. Análises dos haplótipos.....	26
4. RESULTADOS e DISCUSSÃO	27
5. CONCLUSÕES	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7. ANEXO I.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Municípios infestados por <i>A. aegypti</i> (porção escura) durante cinco anos ou mais, no período de 1995 a 2005 (SESA/PR).....	3
Figura 2: Fêmea de <i>Aedes aegypti</i> mostrando tarsos com marcações em forma de listras brancas e o mesonoto com desenho em forma de lira	4
Figura 3: Distribuição de casos autóctones de dengue nas dez mesorregiões do Estado do Paraná (SESA/PR).....	9
Figura 4: Incidência de dengue/100.000 habitantes em estudo realizado em todos os municípios do Estado do Paraná.....	11
Figura 5: Mapa do Estado do Paraná apresentando as delimitações dos municípios e a localização dos municípios de: Maringá, Loanda, Ubatã, Pato Bragado, Santa Helena, Foz do Iguaçu e Cascavel, onde foram amostradas populações de <i>Aedes aegypti</i> e <i>Aedes albopictus</i>	19
Figura 6: Gel de agarose 2%, submetido à eletroforese e corado em brometo de etídio para confirmação do tamanho do fragmento de NADH4 amplificado e especificidade dos iniciadores utilizados. Poços 1-5 e 7-11: indivíduos de <i>A. aegypti</i> de Santa Helena. Poço 6: marcador de massa molecular	22
Figura 7: Frequência relativa dos nove haplótipos detectados nas populações de <i>Aedes aegypti</i> provenientes de Cascavel, Foz do Iguaçu, Loanda, Maringá, Pato Bragado, Santa Helena e Ubatã, Paraná	30
Figura 8: Gráfico de regressão de Mantel para as populações de <i>Aedes aegypti</i> com uso de <i>Fst</i> par a par. $R=-0,0659$; $p=0,5770$	40
Figura 9: Gráfico de regressão de Mantel para as populações de mesorregião Oeste de <i>Aedes aegypti</i> com uso de <i>Fst</i> par a par. $R=-0,2027$; $p=0,5420$	41

Figura 10: Dendrograma dos nove haplótipos de *Aedes aegypti* utilizando o método de Neighbor-Joining (modelo de distância genética de Tamura-Nei), com inclusão de *Ae. albopictus* como grupo externo. Os valores de bootstrap encontram-se nos ramos 43

Figura 11: Rede de haplótipos com base no método de parcimônia máxima. 44

LISTA DE TABELAS

Tabela I: Série histórica de casos de dengue no Estado do Paraná	10
Tabela II: Localização das populações de <i>A. aegypti</i> , distribuição por mesorregião, coordenadas geográficas, período de instalação, positividade, número de ovos, adultos e total de <i>A. aegypti</i> preservados	18
Tabela III Localidade de coleta dos indivíduos de <i>A. aegypti</i> sequenciados do Estado do Paraná, número de indivíduos utilizados e haplótipos resultantes.....	29
Tabela IV: Posição das mudanças nucleotídicas nos nove haplótipos encontrados nas populações de <i>A. aegypti</i> do Paraná.....	31
Tabela V: Diversidade genética calculada para sete populações de <i>Aedes aegypti</i> do Paraná.....	32
Tabela VI: Resultado dos testes de neutralidade de populações de <i>A. aegypti</i> do Estado do Paraná.....	34
Tabela VII: Análise de variância molecular (AMOVA) considerando todas as populações de <i>Aedes aegypti</i> consideradas no Paraná em um único grupo.....	36
Tabela VIII: Análise de variância molecular (AMOVA) considerando as populações de <i>Aedes aegypti</i> do Estado do Paraná de maneira separada, em agrupamentos por mesorregiões.....	36
Tabela IX: Valores de <i>Fst</i> par a par para populações de <i>Aedes aegypti</i> das cidades estudadas no Estado do Paraná	39
Tabela X: Valores de <i>Nm</i> (número efetivo de migrantes) entre indivíduos provenientes das populações de <i>Aedes aegypti</i> das sete cidades paranaenses estudadas.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

RAPD - Random Amplification of Polymorphic DNA

SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism

LISTA DE SIGLAS

F_{ct} - permutação entre os grupos

F_{sc} - permutação entre populações dentro dos grupos

F_{st} - permutação dentro das populações

F_{st} par a par - índice de fixação

H_d - diversidade de haplótipos

K - número médio de diferenças nucleotídicas

N_m - número efetivo de migrantes

P_i - diversidade nucleotídica

RESUMO

Aedes aegypti é um mosquito vetor de grande importância epidemiológica no Brasil pelo fato de ser transmissor de dengue e de febre amarela em área urbana. Sua distribuição contempla todo o território brasileiro e no Paraná concentra-se nas regiões de clima mais quente e úmido. Quanto à doença, o Paraná contribui com valores crescentes no número de casos que ocorrem anualmente no país. Diante deste problema pertinente de saúde pública foi realizado estudo do perfil genético de algumas populações de *A. aegypti* do Estado do Paraná, baseado na utilização de fragmento parcial do gene mitocondrial NADH4. Sete municípios de quatro diferentes mesorregiões foram estudados: Oeste (Cascavel, Foz do Iguaçu, Pato Bragado e Santa Helena), Noroeste (Loanda), Centro Oriental (Ubiratã) e Norte Central (Maringá). Os municípios foram escolhidos por apresentar o vetor e importante incidência de casos de dengue. Vinte e três indivíduos tiveram 343 pares de bases de NADH4 analisadas, com detecção de nove haplótipos, sendo que oito destes foram *singletons*. O haplótipo mais freqüente foi encontrado em Cascavel, Foz do Iguaçu, Maringá, Pato Bragado e Santa Helena. Um dos haplótipos *singletons* foi coincidente com sequência encontrada no *GenBank* para populações do Brasil ainda não publicadas, o que demonstra relacionamento de populações paranaenses com outros locais do território nacional. As populações mostraram-se altamente estruturadas, com pequena troca de indivíduos por geração. Não há correlação entre a distância geográfica das localidades amostradas e a distância genética dos haplótipos presentes em cada local. Testes de neutralidade detectaram presença de substituições deletérias no total das populações e em Santa Helena, que evidencia que estas mutações ocorreram recentemente. Dois *clusters* foram encontrados entre os haplótipos, sugerindo a possível presença de duas linhagens distintas de *A. aegypti* presentes no Estado do Paraná. Estes resultados podem fornecer subsídios para o entendimento da dinâmica do vetor no estado do Paraná.

ABSTRACT

Aedes aegypti is a vector mosquito of great epidemiological importance in Brazil due to be the vector of dengue and yellow fever in urban areas. Its distribution covers the entire Brazilian territory, and in Paraná it is mainly found on regions of warmer and wet climate. Paraná contributes with increasing numbers of cases of dengue that occur annually in the country. Because of the relevant public health issue, a study of genetic profile of some populations of *A. aegypti* from the State of Parana was done, on the basis of partial fragment of the mitochondrial gene NADH4. Seven cities from four different mesoregions were studied: West (Cascavel, Foz do Iguaçu, Pato Bragado, and St. Helena), Northwest (Loanda), Central East (Ubirata) and North Central (Maringa). Cities were chosen for the vector presence and importance in cases of the issue. Twenty-three individuals had 343 pairs of bases NADH4 analyzed with detection of nine haplotypes, eight of these being singletons. The most frequent haplotype was found in Cascavel, Foz do Iguaçu, Maringa, Pato Bragado, and St. Helena. One of the singletons haplotypes was coincident with sequences found in the GenBank for the Brazilian population not yet published, which shows the relationship of populations from Parana with other areas in the country. The populations were highly structured, with little exchange of individuals per generation. There is no correlation between geographic distance from the sampled localities and genetic distance of the haplotypes present in each location. Neutrality tests detected the presence of deleterious changes in the total of the populations and in St. Helena, which shows that these mutations occurred recently. Two clusters were found among haplotypes, suggesting the possible presence of two distinct strains of *A. aegypti* in the state of Parana. These results may provide support to understanding the dynamics of the vector in the state of Parana.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Culicidae

A família Culicidae, do latim *cullex* que significa mosquito, é representada por aproximadamente 3.500 espécies de insetos conhecidos pelo grande público por mosquitos. A importância da família está relacionada com o fato de grande parte de seus representantes estarem envolvidos na transmissão de patógenos ao homem. Sua ocorrência é relatada para quase todo o mundo, com exceção somente para locais permanentemente congelados (Forattini 2002).

Na subfamília Culicinae estão alocados 35 gêneros, distribuídos em 11 tribos. A tribo Aedini compreende nove gêneros, dentre os quais três tem representantes na região Neotropical: *Aedes*, *Psorophora* e *Haemagogus*. No Brasil ocorrem quatro subgêneros do gênero *Aedes*: *Ochlerotatus*, *Stegomyia*, *Howardina* e *Protomacleaya*. Em *Stegomyia* é importante ressaltar duas espécies de origem no Velho Mundo que invadiram outras regiões zoogeográficas, inclusive o Brasil: *A. (Stegomyia) aegypti* e *A. (Stegomyia) albopictus*, apresentando distribuição descontínua por ter sido disseminada passivamente pelo homem durante suas migrações (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini 2002).

1.2. *Aedes aegypti*

1.2.1. Origem e dispersão

Aedes (Stegomyia) aegypti (Linnaeus, 1762) têm origem no continente africano (região etiópica) tendo sua primeira descrição feita no Egito. No Brasil está associado a áreas com grande concentração humana, enquanto no Velho Mundo, que compreende Europa, África e Ásia, também ocorre em locais afastados de aglomerados humanos. Hoje é encontrado nas regiões Tropical e Subtropical, entre os paralelos 45° de latitude Norte e 40° de latitude Sul (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994; Forattini 2002).

A ocorrência de epidemias de febre amarela, doença que tem *A. aegypti* como transmissor em área urbana, levou ao combate do vetor a partir da década de 1940. A espécie foi erradicada em 1955, voltando a ser detectado em 1967 no estado do Pará. Em 1973 ocorreu pela segunda vez sua erradicação. Em 1976 foi novamente detectado em Salvador e a partir de então não mais foi possível sua eliminação total no país (Tauil 2002). Desde então nenhuma campanha foi eficaz na erradicação nem pôde conter seu avanço, em área, no território nacional. Hoje a espécie é encontrada em todos os estados brasileiros, inclusive no distrito federal (Consoli & Lourenço-de-Oliveira, 1994).

No Paraná não há datação clara sobre a entrada da espécie, porém relatos de febre amarela, arbovirose também transmitida em ambiente urbano por *A. aegypti*, no início do século XVII denotam a presença do vetor nesta época. A principal via de entrada provavelmente foi o Porto de Paranaguá, que apresentava intenso tráfego marítimo na época (Roncaglio *et al.* 2001). Em 1985, após as erradicações que ocorreram em todo o país, a espécie volta a ser detectada por Lopes *et al.* (1993) no Estado, na cidade de Londrina.

No mapa a seguir visualizam-se os locais de ocorrência de *A. aegypti* no Estado do Paraná entre os anos de 1995 e 2005 (Figura 1).

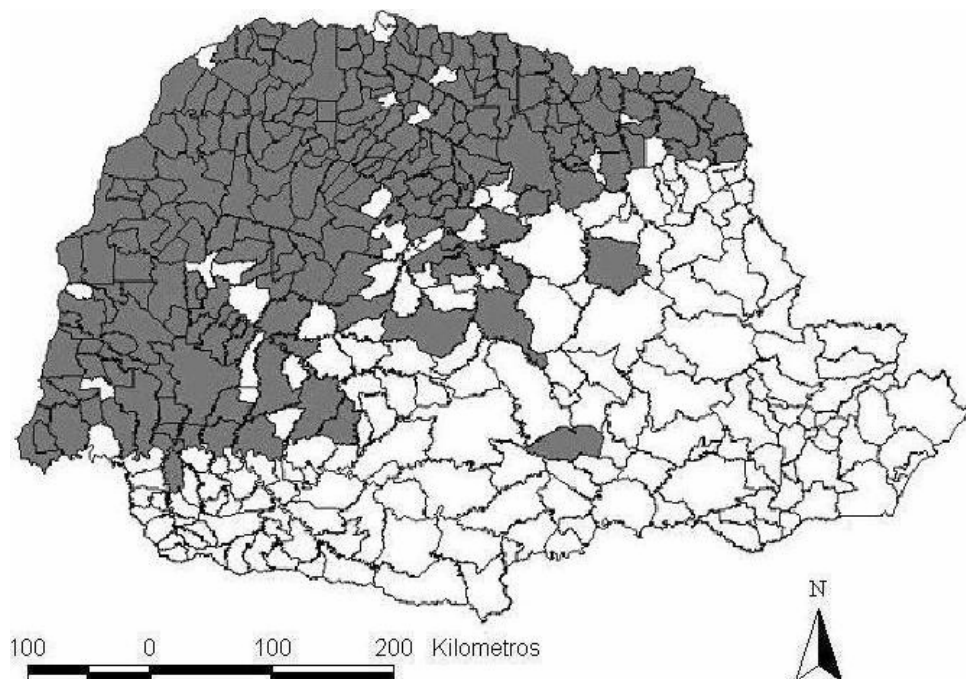


Figura 1: Municípios infestados por *A. aegypti* (em escuro) durante cinco anos ou mais, no período de 1995 a 2005 (SESA/PR).

1.2.2. Características e biologia

A. aegypti é um mosquito de coloração escura (de castanho escuro à preta), com escamas brancas presentes nas pernas (formando listras transversais) e na região do escudo torácico, onde formam duas linhas nas porções laterais, resultando num desenho parecido com uma lira (Figura 2) (Forattini, 2002).

Esta espécie tem hábitos sinantrópicos e antropofílicos, colonizando, no ato de oviposição, inúmeros recipientes com acúmulo de água, permanentes ou temporários, encontrados em área urbana. Nesses locais, chamados sítios de oviposição, ocorrerão os estágios imaturos, larvais e pupal, do inseto.



Fonte: BVS/MS

Figura 2: Fêmea de *Aedes aegypti* mostrando tarsos com marcações em forma de listras brancas e o mesonoto com desenho em forma de lira.

Sabe-se que as fêmeas grávidas de *A. aegypti* respondem a estímulos visuais, olfativos e quimiotáteis para a realização da oviposição. Em estudos de preferência a escolha das fêmeas apresentou maior propensão à atração para oviposição em águas residuais e água de lagos quando estas apresentam coliformes fecais e coliformes totais, sugerindo que, na verdade, a atração pode estar sendo exercida por odores emanados por esses locais. Águas que passaram por tratamento com cloro, como água de torneira e de piscina mostraram-se com ação repelente quanto à oviposição das fêmeas (Navarro *et al.* 2003). Também há estudos que ressaltam a preferência por oviposição em locais externos às construções, com menor quantidade de ovos observada em locais abrigados (Dibo *et al.* 2005).

Mesmo não percorrendo grandes distâncias através de vôo, cerca de 50 a 100 metros no máximo, as fêmeas à procura de locais para ovipositar podem dispersar rapidamente em detrimento da disponibilidade de sítios para oviposição. Assim a atividade ovipositora durante um único ciclo gonotrófico pode estender-se por dias e alcançar uma área de ao menos 840 metros de diâmetro (Reiter *et al.*

1995). Após um repasto sanguíneo (alimentação com sangue realizada pelas fêmeas) e na ausência de novos repastos a fêmea pode continuar ovipositando por um período de dez dias, dividido em três ou quatro ciclos de oviposição. Sob condições de estresse por umidade (seca) e alimentar (alta concentração de açúcar) a oviposição pode ser atrasada por período de um a quatro dias, que segundo Canyon *et al.* (1999) é a extensão máxima de períodos de baixa umidade extrema na natureza.

Aproximadamente três dias após a oviposição os ovos já tem o embrião totalmente formado, podendo o tempo de desenvolvimento variar de acordo com as condições ambientais. A fase aquática compreende quatro estágios larvais e um pupal. Em ambiente estritamente antrópico, larvas em desenvolvimento e ovos podem ser encontrados com maior frequência no peridomicílio quando comparado ao intradomicílio, em vasos e pratos de plantas, ralos, garrafas, plantas que acumulam água, como bromélias, e as fêmeas parecem ter preferência por ovipositar em locais com maiores volumes de água (Chiaravalloti-Neto 1997; Zahiri & Rau, 1998; Forattini & Marques 2000; Calderón-Arguedas *et al.* 2004; Silva *et al.* 2006).

No estágio larval o *A. aegypti* alimenta-se de partículas em suspensão na água e tem duração de quatro a oito dias. A pupa tem duração de dois dias (Consoli & Lourenço-de-Oliveira 1994; Forattini, 2002).

Tanto machos quanto fêmeas têm preferência por buscar abrigo no interior de domicílios (Lima-Camara *et al.* 2006). Ambos utilizam de fontes alimentares ricas em sacarose, como alguns recursos vegetais, e apresentam grande resistência na ausência de alimentação. O estresse fisiológico causado por privação de alimentação causa mudanças no metabolismo, principalmente nas fêmeas. Estas, no entanto, necessitam realizar também alimentação sanguínea como fonte de proteínas a fim de maturar seus ovos. Essa alimentação, chamada repasto sanguíneo, é realizada preferencialmente no período diurno. Durante esse evento pode ocorrer a infecção do mosquito por algum vírus ou a transmissão do vírus ao hospedeiro humano.

Estudos realizados sob condições de laboratório revelam alguns detalhes importantes quanto ao repasto sanguíneo, como a preferência por sangue humano frente ao sangue de ratos pelo fato do primeiro apresentar maior quantidade de glicose quando comparado com o segundo, por exemplo, acarretando aumento de

fitness (sucesso reprodutivo) e síntese de reservas energéticas nas fêmeas (Harrington *et al.* 2001). A atividade hematofágica é realizada em ambiente antrópico, preferencialmente no intradomicílio (Gomes *et al.* 2005).

Todo o período de desenvolvimento da eclosão até a emergência do indivíduo adulto tem duração de aproximadamente dez dias, o que pode variar conforme condições ambientais. Em condições de menores temperaturas (17°C) o processo torna-se mais lento (10 – 17 dias), enquanto em temperaturas mais altas (30°C) o desenvolvimento pode ocorrer em períodos de 6 a 8 dias (Hien 1975).

1.2.3. Infecção por vírus

A. aegypti participa da transmissão, em ciclos urbanos, dos quatro sorotipos do vírus da dengue (DEN1, DEN2, DEN3 e DEN 4) e do vírus da febre amarela, ambos da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*. Vale ressaltar que o vírus da dengue é o único dentro da família Flaviviridae, gênero *Flavivirus*, que não necessita manutenção de ciclos em ambientes silvestres. Os sorotipos são antigenicamente diferentes, porém apresentam a mesma epidemiologia (Gubler 2002). Os sorotipos têm história evolutiva relativamente recente, tendo origem há cerca de um século, somente estabelecendo transmissão endêmica em humanos neste mesmo período de tempo (Holmes & Twiddy 2003).

Num modelo geral de infecção de *A. aegypti* por um vírus, há diversos obstáculos a serem vencidos até o momento de uma fêmea estar apta a infectar um hospedeiro. Como exemplo a composição do tubo digestivo, uma vez que a matriz peritrófica é a primeira barreira física que o vírus precisa ultrapassar quando adquirido pelo vetor (Bosio *et al.* 2000; García-Franco *et al.* 2002; Bennett *et al.* 2002).

Vírus de RNA, como os da família Flaviviridae, tem alta variabilidade genética por apresentar alta taxa intrínseca de mutação associada a RNA polimerase, altas taxas de replicação e grande tamanho populacional. Uma vez adquirido pelo vetor, o vírus permanece nele durante toda sua vida. Esses vírus ligam-se e aderem-se à membrana das células através da proteína E, porém os receptores nas células do hospedeiro ainda continuam obscuros, mas são comuns a todos os sorotipos. Após a ligação, pode ou não ocorrer replicação viral nas células

do intestino médio do mosquito, sem prejuízo direto a este. Se ocorrer replicação, diz-se que o vírus venceu a barreira do intestino médio que é fator determinante no que diz respeito à competência vetora. Após ultrapassar a barreira do intestino médio (matriz peritrófica e epitélio intestinal) o vírus tem que ser capaz de sair das células intestinais onde ocorreu replicação, ganhar a hemocele para poder replicar novamente, mas agora em células de outros tecidos. Essa é a barreira de evasão do intestino. Depois de novos ciclos replicativos, o vírus necessita entrar nas glândulas salivares, ultrapassando as suas barreiras. Esse é o último local que o vírus ocupa antes de ser ejetado, juntamente com a saliva, em um hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (Holmes & Twiddy 2003).

1.3. Dengue

A dengue é uma doença reemergente considerada um dos principais problemas mundiais quando se trata de saúde pública. É endêmica na África, Oeste do Pacífico, Leste do Mediterrâneo, Sudoeste Asiático e nas Américas (WHO 2003). Cerca de 2,5 milhões de pessoas que habitam regiões tropicais estão em áreas de risco de ocorrência da doença, estimando-se infecção de 50 a 100 milhões de pessoas por ano em todos os continentes com exceção da Europa, com cerca de 20 mil mortos por ano (SVS, Ministério da Saúde, 2008).

É uma arbovirose que por definição requer dois hospedeiros, um vertebrado e um artrópode. Geralmente o vírus tem que produzir um alto nível de viremia no hospedeiro vertebrado para que o artrópode possa infectar-se durante o repasto sanguíneo (Gubler 2002). Estudos filogenéticos utilizando sorotipo 2 do vírus reforçam a hipótese de que houve adaptação de um vírus silvestre da dengue a vetores peridomésticos urbanos do gênero *Aedes*, *A. aegypti* e *A. albopictus*. Até então era mantido ciclo entre o vírus silvestre da dengue com primatas não humanos e mosquitos do gênero *Aedes* em áreas de floresta (Moncayo *et al.* 2004).

O primeiro relato da doença data do final do século XVIII, no Sudoeste Africano e Estados Unidos, porém somente foi reconhecida como doença pela OMS no século XX (SVS, Ministério da Saúde, 2008). Nas Américas a dengue ocorre desde o século XIX, com período de silêncio epidemiológico no início do século XX,

com reintrodução dos sorotipos 2 e 3 associado a formas clássicas de manifestação da doença na década de 60 (Teixeira *et al.* 1999).

Na década de 1940 a *Pan American Health Organization* (OPAS) iniciou programa de erradicação do vetor no Continente Americano, com cobertura de 73% das áreas infestadas, porém a partir de 1970 houve reinfestação pelo vetor, que aumentou em densidade juntamente com o crescimento populacional em áreas com urbanização não planejada, enquanto o transporte facilitou fluxo de genótipos e cepas do vírus (Gubler 2002).

Os casos de febre hemorrágica da dengue estão aumentando de maneira exponencial em todo o mundo nas últimas décadas. A expansão da dengue nas Américas deve-se a diversos fatores como: extensa presença de vetor, controle ineficiente do mesmo, aumento da densidade humana em áreas urbanas, utilização de depósitos inapropriados de água, entre outros (CDC, 2008).

No Brasil a doença apresenta padrões sazonais, com maiores índices de ocorrência nos cinco primeiros meses do ano, correspondendo ao período quente e úmido do clima tropical. A primeira epidemia, depois de sua reintrodução na década de 70, ocorreu em Boa Vista (RR), onde foram isolados os sorotipos 1 e 4 em 1981. A partir de 1986 todas as regiões do país apresentam circulação viral (DEN1) e em 1990 é introduzido o DEN2 no país (Funasa, 1999). Na análise das características regionais da doença não foram relatadas diferenças qualitativas entre as regiões, porém quantitativamente os resultados permitiram dividir o país em dois grupos: um primeiro, com maior número de casos (85,5%), que agrupa Nordeste e Sudeste e um segundo com quantidades bem menores de ocorrência, que compreende Sul, Centro-Oeste e Norte. As regiões Nordeste e Sudeste são as que apresentam os maiores índices de notificação, porém as demais regiões do país não deixam de ter importância no cenário nacional de dengue por também apresentarem casos da doença (Câmara *et al.* 2007).

Os primeiros casos de dengue no Estado do Paraná foram notificados no ano de 1991, com casos autóctones ocorrendo somente em 1993. A partir de então, epidemias ocorrem anualmente no Estado. O Paraná apresentou grande número de casos notificados no ano de 2003, seguido de declínio nos anos seguintes (SESA Paraná). No ano de 2008 foram notificados 17110 casos, queda de 96,84% em relação a 2007, com confirmação de 957 casos, (queda de 65,02%), ano em que o

Estado contribuiu com 10,2% dos casos que ocorreram no país (Ministério da Saúde, 2008) (Tabela 1).

Os casos autóctones de dengue no Paraná (Figura 3) distribuem-se nas mesorregiões Oeste, Nordeste, Centro Oriental, Norte Central e Norte Pioneiro do Paraná, locais de temperaturas mais elevadas e verões chuvosos. O Norte Pioneiro é a mesorregião que menos contribui com número de casos dentre as citadas.

Das cidades avaliadas no presente estudo, Foz do Iguaçu (Oeste) é a que apresenta maior número de casos de dengue por anos consecutivos. Neste município o controle do vetor merece atenção especial por ser área de grande fluxo de pessoas em consequência da fronteira com o Paraguai e Argentina.

Após Foz do Iguaçu, Maringá (Norte Central) e Cascavel (Oeste) são as cidades que apresentam números elevados de casos de dengue. Em 2007 outro município também com número preocupante de casos foi Ubatuba. .

No ano de 2007 a Secretaria de Saúde alertou para a presença de casos de febre amarela urbana na cidade de Santa Helena.

Uma visão mais geral dos locais do Estado com maior incidência de casos de dengue/100.000 habitantes nos últimos dois anos pode ser visualizado na figura 4.



Figura 3: Distribuição de casos autóctones de dengue nas dez mesorregiões que compõe o Estado do Paraná (SESA/PR).

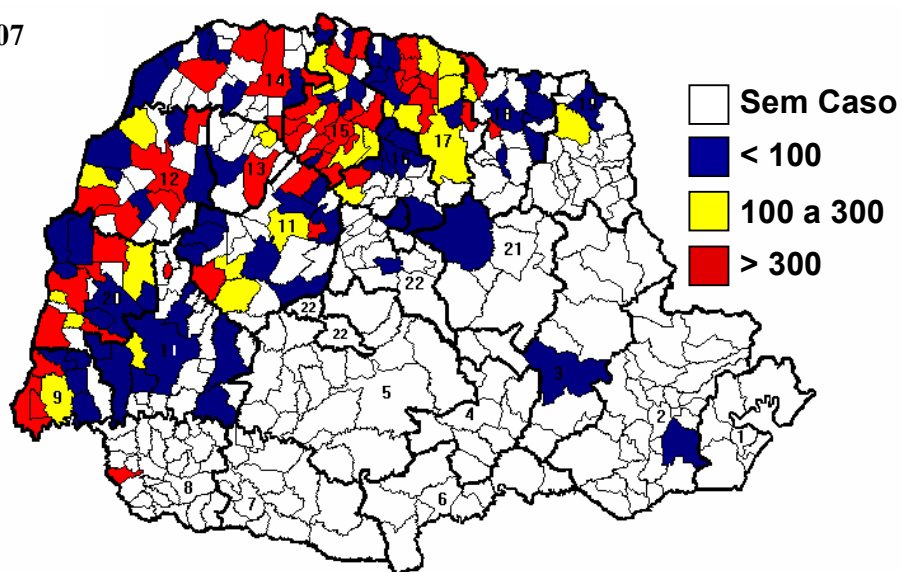
Tabela I: Série histórica de casos de dengue no período de 1991 a 2008 no Estado do Paraná.

ANO	NOTIFICADOS	CONFIRMADOS		
		AUTÓCTONES	IMPORTADOS	TOTAL
1991	161	-	16	16
1992	59	-	3	3
1993	59	3	3	6
1994	69	1	7	8
1995	3.595	1.519	342	1.861
1996	5.178	3.049	146	3.195
1997	1.192	3	10	13
1998	2.747	534	49	583
1999	1.314	266	43	309
2000	4.419	1.708	143	1.851
2001	3.845	1.164	124	1.288
2002	13.167	4.731	433	5.164
2003	23.890	9.230	208	9.438
2004	3.392	57	50	107
2005	4.831	882	107	989
2006	5.380	830	311	1.141
2007*	50.160	25.070	918	25.988
2008*	9.849	435	111	546

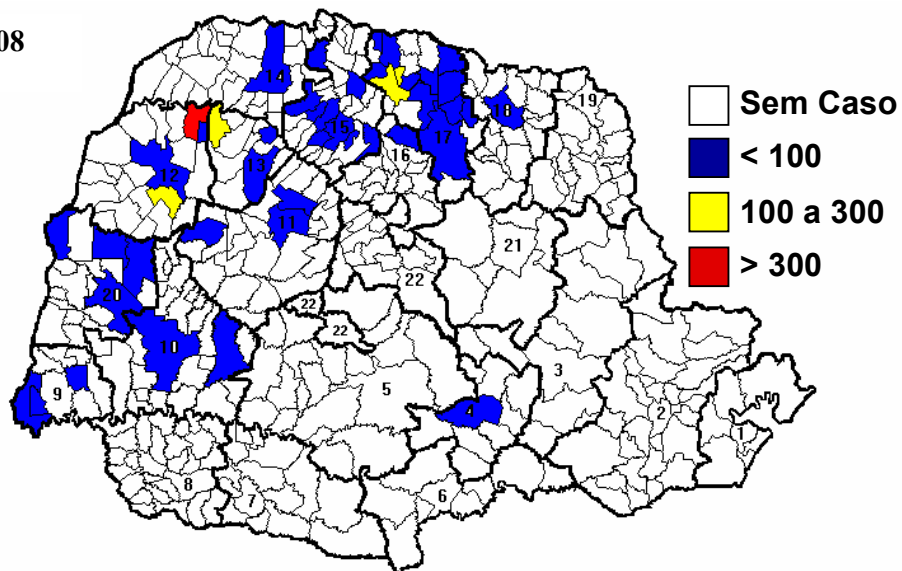
*Dados de 12/05/2008 sujeitos à alteração

Fonte: SESA/SVS/DEVA/DVDTV

2007



2008



Fonte: SESA/SVS/DEVA/DVDTV

Figura 4: Incidência de dengue/100.000 habitantes em estudo realizado em todos os municípios do Estado do Paraná.

1.4. DNA mitocondrial

DNA nuclear e mitocondrial refletem informações da biologia e história evolutiva da espécie.

O DNA mitocondrial (mtDNA) é uma molécula única e circular em animais, sendo um genoma pequeno (15 a 20 kb) contendo 37 genes dentre os quais dois para rRNAs (RNAs ribossomais), 13 para proteínas e 22 para tRNAs (RNAs transportadores). É de herança materna (uniparental) com ausência de recombinação e apresenta altas taxas evolutivas, quando comparada com DNA nuclear (cerca de 10 vezes maior), e por esses motivos mostra-se como uma importante ferramenta para estudo de relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações. As altas taxas de mutação no mtDNA estão relacionadas com a eficiência das enzimas envolvidas no reparo na replicação, enzimas que são codificadas por genes nucleares (Matioli 2001).

Quando o DNA é não codificador ele tem taxa de evolução cerca de três vezes mais rápida que DNA codificador e têm maior frequência de indels (inserções e/ou deleções), porém regiões não codificadoras são raras em genoma de organelas, como cloroplastos e mitocôndrias (Matioli 2001).

Muitos aspectos ligados à evolução genômica podem ser estudados à luz do mtDNA em níveis de detalhamento e entendimento não possível atualmente para o DNA nuclear (Boore 1999).

Os genes codificadores das sete subunidades de nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH) acumulam rapidamente mudanças de bases, sendo assim de grande utilidade em estudos populacionais, até mesmo podendo ser utilizados em locais onde a presença da espécie não ocorre há muito tempo, como no caso uma espécie invasora de não longa ocorrência na região em questão (Matioli 2001).

1.5. Estudos com mtDNA em *Aedes aegypti*

Desde a década de 1950 avanços vêm sendo feitos em estudos genéticos de mosquitos, principalmente nos gêneros *Aedes*, *Anopheles* e *Culex*, sobretudo no que diz respeito à estrutura, organização e evolução do genoma, sendo que os mosquitos representam um dos grupos melhor estudados (Rai 1999).

Estudos apresentam importantes aspectos de populações de *A. aegypti* em diversas partes do mundo. Na Tailândia, Chareonviriyaphap & Lerdthusnee (2002) realizaram estudos com isoenzimas em cinco populações de duas zonas geográficas, revelando grande migração efetiva entre populações localizadas nas duas ilhas e nenhuma diferença significativa entre elas. Também com uso de isoenzimas somado a microsatlélites, Huber *et al.* (2002) estudaram populações provenientes de diferentes períodos e condições ambientais da cidade de Ho Chi Minh (Vietnã) revelando grandes diferenças na estruturação genética entre estações chuvosas e secas, com maior estruturação e aumento populacional durante períodos chuvosos.

Sete populações de Taiwan puderam ser separadas em dois clados, Nordeste e Sudeste, com uso de RAPD. Na segunda região as populações apresentavam isolamento por distância e 84% da variação ocorreu entre populações. O nível de diferenças genéticas e distâncias genéticas são positivamente correlacionadas (Su *et al.* 2003).

No Camboja, estudo realizado através do uso de aloenzimas revelou que o tipo de sítio de oviposição está relacionado com o grau de diferenciação genética. Os animais provenientes de reservatórios abandonados, como pneus, garrafas e outros objetos que podem represar água, apresentaram maior grau de diferenciação que os de reservatórios domésticos (Paupy *et al.* 2004). Para o mesmo país, utilizando-se isoenzimas, foi detectado baixo nível de diferenciação genética e nenhuma associação significativa entre distância geográfica e diferenciação genética, que pode ter sido causado, ao menos parcialmente, pela abundância de criadouros domésticos diminuindo o movimento de *A. aegypti* e consequentemente as trocas genéticas (Paupy *et al.* 2005).

Estudos realizados com 10 populações da costa nordeste do México revelaram formação de dois clados entre os sete haplótipos mitocondriais encontrados através do uso de RAPD e SSCP da região do gene mitocondrial

NADH4. Dados provenientes da primeira técnica indicaram isolamento por distância e fluxo gênico em distâncias de até 250 km, o que não foi detectado utilizando dados de mtDNA (Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2000). Posteriormente, Gorrochotegui-Escalante *et al.* (2002) estudaram 38 populações de cidades da costa do país, realizando SSCP em sequências de NADH4 com detecção de 25 haplótipos. As populações do Nordeste são mais diferenciadas quando comparadas com as do Pacífico e Yucatan, apresentando também menor diversidade genética.

Estudos realizados com NADH4 em três localidades do Peru revelaram presença de três haplótipos, um deles compartilhado por duas localidades, enquanto na outra dois haplótipos foram detectados. Maior nível de variação molecular ocorreu dentro das populações, com medidas de distância genética entre haplótipos sugerindo entrada de duas linhagens de *A. aegypti* no país (Costa-da-Silva *et al.* 2005). Na Argentina, Sousa *et al.* (2001) detectaram altos valores de *Fst* entre populações distantes no território, com presença de zonas de maior diversidade populacional coincidentes com locais de fronteira com outros países onde ocorre *A. aegypti*.

Bracco *et al.* 2007 realizaram estudos com *A. aegypti* das Américas com uso de NADH4 como marcador, encontrando 20 haplótipos, sendo 14 exclusivos para Américas, quatro só para Ásia e África, um compartilhado entre América e África e um comum às Américas e Ásia. Esses dados evidenciam presença de duas linhagens: uma relacionada à África (Senegal) e outra África e Ásia (Guiné e Uganda), sugerindo duas possíveis subespécies circulando nas Américas.

O isolamento por distância também apresentou índices menores no Nordeste do Brasil do que nas demais regiões do país. O grau de polimorfismo genético foi alto em trabalho realizado com 15 populações de cinco estados do Brasil com uso da técnica RAPD. Também foi detectado alto nível de diferenciação genética com valores maiores que os já encontrados para *A. aegypti* em outros países (Ayres *et al.* 2003). Altos níveis de polimorfismo e diferenciação genética foram detectados em estudo realizado com RAPD com *A. aegypti* provenientes de 11 localidades de quatro regiões do Brasil, sugerindo alta diferenciação nas populações (Paduan *et al.* 2006).

Estudos realizados no Rio de Janeiro utilizando microsatélites e isoenzimas revelaram maior eficiência do primeiro marcador, sendo as populações tão variadas no centro quanto na periferia do município (Costa-Ribeiro *et al.* 2006). Análises com

RAPD realizadas no estado de São Paulo revelaram duas linhagens diferenciadas, uma que engloba Oeste e outra com animais de laboratório juntamente com animais de Santos, maior porto da América Latina, não permitindo conclusões acerca da origem destas linhagens (Santos *et al.* 2003).

Em vista da grande e fácil movimentação de *Aedes aegypti* através de transporte humano é de grande valia o estudo do perfil genético de indivíduos da espécie. Conhecer as diferenças entre as populações fornece subsídios para o controle do vetor, uma vez que cada unidade populacional pode ser tratada de maneira independente. O estudo de haplótipos pode ser indicativo para a movimentação do vetor e presença de haplótipos únicos indica resposta da população à pressão seletiva pela qual pode ter passado ou estar passando, o que pode ser detectado pelo uso de subunidades do gene codificador da nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH) já que estas acumulam rapidamente mudanças de bases. Tendo visto a escassez de dados para o Estado do Paraná, que vêm crescendo em importância no cenário nacional em decorrência do número de casos de dengue, faz-se necessário estudo das populações do vetor presentes no Estado, sobretudo nos locais de sua maior ocorrência.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil genético, baseado em fragmento da subunidade 4 do gene mitocondrial NADH4, de populações de *Aedes aegypti* de cidades do Estado do Paraná.

2.1. Objetivos específicos

Verificar a presença de diferentes haplótipos de *A. aegypti* dentro das populações.

Conhecer e comparar o grau de variabilidade inter e intra-populacional de *A. aegypti*.

Estimar o fluxo gênico entre as populações de *A. aegypti* considerando informações de distância genética e geográfica entre as populações.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos espécimes

Espécimes de *Aedes aegypti* utilizados no presente estudo foram obtidos através de colaboração entre o Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária da Universidade Federal do Paraná (LEMV) e a Secretaria Estadual de Saúde do Estado do Paraná (SESA/PR).

Armadilhas de oviposição (ovitampas) foram instaladas por agentes de Núcleos de Entomologia da SESA/PR em cidades com importância epidemiológica no cenário atual de ocorrência de casos de dengue. As cidades amostradas pertencem a quatro mesorregiões do Estado: Oeste (Cascavel, Foz do Iguaçu, Pato Bragado e Santa Helena), Noroeste (Loanda), Centro Oriental (Ubiratã) e Norte Central (Maringá). A data de instalação das ovitampas, localização das cidades, bem como maiores detalhes sobre a dinâmica de *A. aegypti*, e também *A. albopictus*, estão disponíveis na tabela 2.

As armadilhas eram formadas por recipientes plásticos escuros (preto) com capacidade de 500 ml de líquido contendo de 10 a 30% de solução de feno, em cujas paredes foram afixadas, com auxílio de cliques metálicos, paletas de fibra de madeira reconstituída (Eucatex® ou Duratex®) (15 cm X 3 cm) ficando cerca de metade desta imersa na solução. Após cinco dias da instalação em campo, as armadilhas foram retiradas e levadas ao laboratório do Núcleo de Entomologia da SESA onde foi realizada busca por ovos utilizando microscópio estereoscópico e realizando a quantificação dos mesmos. Somente as paletas positivas para ovos foram enviadas ao LEMV, onde foram colocadas individualmente em recipientes plásticos (copos com capacidade de 770 ml) com água suficiente para total submersão das paletas e ração para gatos triturada Purina® Cat Chow® Filhotes (0,36 g/copo) para induzir a eclosão dos ovos aderidos à parede das paletas.

Tabela II: Localização das populações de *A. aegypti*, distribuição por mesorregião, coordenadas geográficas, período de instalação, positividade, número de ovos, adultos e total de *A. aegypti* preservados.

Município	Mesorregião	Coordenadas Geográficas	Período de instalação	Positividade das paletas	N° ovos	N° Adultos	Total de <i>A. aegypti</i> preservados*	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albopictus</i>
Maringá	Norte	23°25'31"S	07/02 - 11/02/2008	62%	2716	1654	1581	77	73
	Central	51°57'00"O							
Cascavel	Oeste	24°57'21"S	30/01 - 04/02/2008	58%	1327	768	700	96	68
		53°27'19"O							
Loanda	Noroeste	22°55'23"S	05/03 - 10/03/2008	70%	2011	515	472	10	43
		53°08'14"O							
Pato Bragado	Oeste	24°37'35"S	03/02 - 07/02/2008	60%	2066	649	277	47	372
		54°13'29"O							
Ubiratã	Centro	24°32'43"S	30/04 - 04/05/2007	55%	2746	1948	321	14	1627
	Oriental	52°59'16"O							
Santa Helena	Oeste	24°51'37"S	05/03 - 09/03/2007	78%	2597	972	482	18	490
		54°19'58"O							
Foz do Iguaçu	Oeste	25°32'52"S	14/03 - 19/03/2007	63,05%	4874	2566	2339	120	227
		54°35'17"O							

*espécimens mantidos em freezer -20°C. Os insetos que não foram preservados foram utilizados para formação de colônias de criação para outros estudos.

Diariamente era realizada troca parcial de água e reposição de ração (1 g/dia). Quando atingiam estágio de pupa estas eram transferidas para recipientes específicos para coleta dos adultos, que eram identificados utilizando chaves de identificação de Consoli & Lourenço-de-Oliveira (1994) e Forattini (2002). Parte dos espécimes de *A. aegypti* foram armazenados em etanol absoluto a -20°C em freezer apropriado no Laboratório de Biologia Molecular Dra. Danúncia Urban, no Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná. Demais exemplares de *A. aegypti* e todos de *A. albopictus* foram utilizados para formação de colônias em laboratório para utilização em outros estudos.

3.2. Localidades amostradas

As cidades amostradas e suas localizações estão ilustradas no mapa (Figura 5).

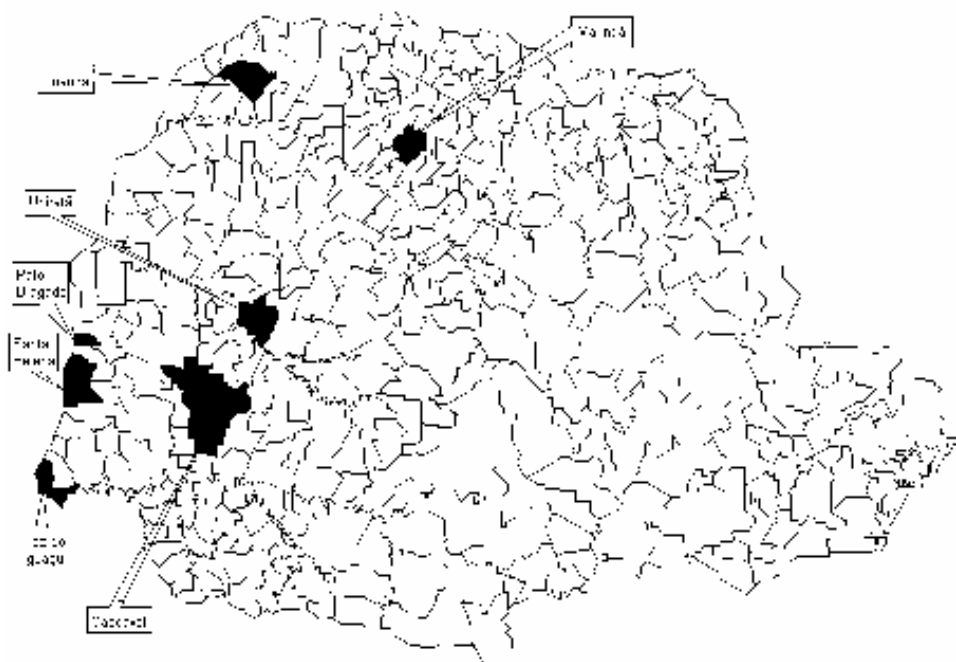


Figura 5: Mapa do Estado do Paraná apresentando as delimitações dos municípios e a localização dos municípios de: Maringá, Loanda, Ubatã, Pato Bragado, Santa Helena, Foz do Iguaçu e Cascavel, onde foram amostradas populações de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*.

3.3. Procedimentos em laboratório

3.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA total dos mosquitos seguiu protocolo de Cheung *et al.* 1993, modificado por França, G. F. (2005) baseado no uso de clorofórmio:álcool isoamílico. Todos os exemplares utilizados não receberam qualquer tipo de alimento pré-extração, para minimizar possíveis contaminações no DNA extraído.

Exemplares adultos foram macerados individualmente em tubo de microcentrífuga de 1.5 ml, contendo 160 µl de tampão de extração (Tris-HCl 200mM pH 8, NaCl 2M e EDTA 70mM), sendo adicionados 20 µl de SDS 10%. A solução foi homogeneizada e incubada por 90 minutos a 60°C. Após resfriamento a temperatura ambiente, acrescentou-se 50 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), centrifugada por 15 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novo tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, adicionado 80 µl acetato de amônio 7,5M e 300 µl de etanol 96%. A solução foi homogeneizada por inversão e mantida por 2 horas em freezer -20°C, para precipitação do DNA. Após 15 minutos de centrifugação a 13000 rpm, o sobrenadante foi descartado, o DNA lavado com 1000 µl de etanol 70% e seco sob estufa a 37°C. O DNA foi ressuspendido em 50 µl de TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 1mM pH8.0) e armazenado a -20°C. A quantificação de DNA presente nas amostras foi realizada em gel de agarose 0.8% por comparação com o padrão de massa molecular.

3.3.2. Reação de amplificação

Parte do gene que codifica para a subunidade quatro da nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADH4) mitocondrial foi amplificada utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR). A região do DNA mitocondrial que corresponde ao gene nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase tem 1343 pares de bases, entre as posições 8027 – 9370 do genoma mitocondrial de *A. aegypti*. As reações de amplificação do gene NADH4 seguiram protocolo estabelecido por Costa-da-Silva *et al.* (2005). As reações foram conduzidas em

volume final de 50 µl, contendo 20mM de Tris-HCL (pH 8,4), 50mM KCl, 0.5mM de cada iniciador, 2mM de MgCl₂, 0.2mM de dNTP, 20 ng de DNA, 2U de *Taq* DNA Polimerase e água ultra pura estéril (Milli-Q®) estéril para completar o volume final. Os iniciadores utilizados nas reações de amplificação, que amplifica região correspondente aos nucleotídeos 8521-8882 de *Aedes albopictus*, foram publicados por Costa-da-Silva *et al.* (2005) e apresentam as sequências a seguir:

Iniciador universal: 5'-ATTGCCTAAGGCTCATGTAG-3'

Iniciador reverso: 5'- TCGGCTTCCTAGTCGTTCAT-3',

As reações foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: um ciclo de 94°C por dois minutos, 35 ciclos de 94°C por um minuto, 56°C por 30', 72°C por um minuto e um ciclo de 72°C por sete minutos.

Após amplificação, 10% do volume do produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 2%, para confirmação do sucesso da amplificação e verificação do tamanho do fragmento amplificado, utilizando como marcador de massa molecular 100pb Ladder (Amresco), como ilustrado na figura 6.

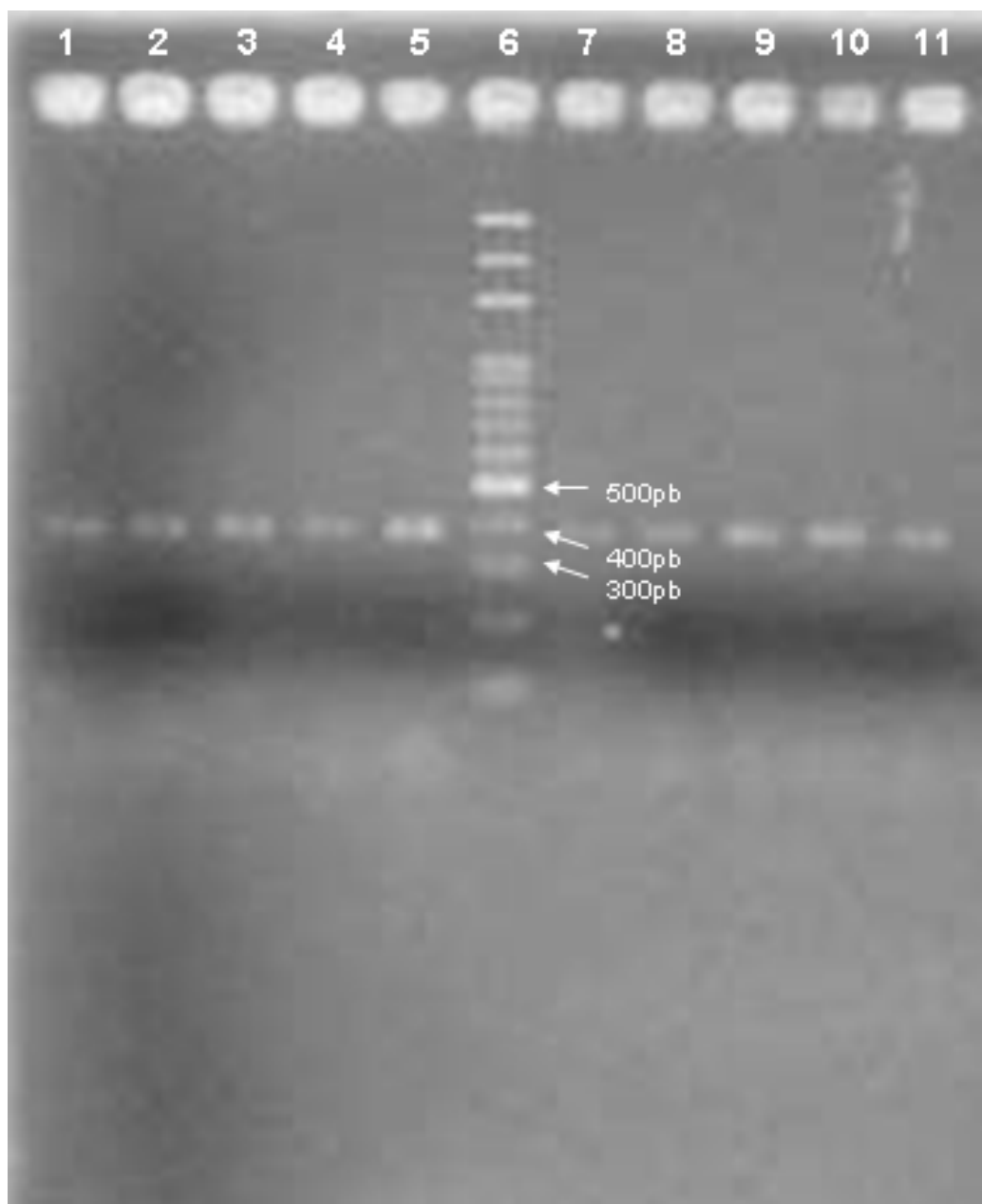


Figura 6: Gel de agarose 2%, submetido à eletroforese e corado em brometo de etídio para confirmação do tamanho do fragmento de NADH4 amplificado e especificidade dos iniciadores utilizados. Poços 1-5 e 7-11: indivíduos de *A. aegypti* de Santa Helena. Poço 6: marcador de massa molecular.

3.3.3. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados utilizando Polietileno Glicol (PEG) 8000 (PEG 20%; NaCl 2,5M), adicionando 1 volume da solução ao produto de PCR, incubado a 37°C (30 minutos). Em seguida passou por centrifugação a 14.000 rpm, retirada do sobrenadante, lavagem com etanol 80% gelado e centrifugação por 2 minutos, etapa repetida duas vezes. Ao final o conteúdo foi seco em estufa e realizada ressuspensão em 8 µl de água ultra pura (obtida do equipamento marca Milli-Q) livre de DNAase. Esta solução foi levada à geladeira, permanecendo por no mínimo 16 horas antes da quantificação, que ocorreu com aplicação de 2 µl do produto em gel de agarose 2% utilizando como parâmetro de comparação o marcador de massa molecular 100pb Ladder (Amresco).

3.3.4. Reações de sequenciamento

As amostras, com no mínimo trinta nanogramas de amplificado, foram posteriormente encaminhadas para a empresa Genomic Engenharia Molecular Ltda. (São Paulo – SP – Brasil) juntamente com os iniciadores citados anteriormente. Neste estabelecimento foram processadas as reações de sequenciamento das amostras utilizando BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Os produtos de sequenciamento foram submetidos à eletroforese em sequenciador modelo 3130xl da Applied Biosystems.

3.4. Análise das sequências

As amostras tiveram suas sequências de consenso geradas no Staden Package, onde foram inspecionadas visualmente os eletroferogramas para busca de possíveis erros de leitura, inserções e deleções. As sequências obtidas foram comparadas com aquelas disponíveis no GenBank, utilizando a ferramenta BLAST, para confirmação da identidade do fragmento gênico amplificado. O alinhamento foi realizado no programa ClustalX 1.8 (Thompson *et al.*, 1997). As sequências foram lidas no programa BIOEDIT (Hall, 1999), sendo novamente inspecionadas

visualmente para busca de possíveis erros, bem como para a codificação de inserções e deleções.

3.5. Análises de Polimorfismo Molecular

3.5.1. Análise de diversidade genética

Haplótipos são conjuntos de sequências que compartilham a mesma composição e ordenamento de nucleotídeos. Diversidade de haplótipos é definida como a probabilidade de duas sequências, escolhidas aleatoriamente em uma população, serem diferentes dentro desta população e diversidade nucleotídica é o número de nucleotídeos diferentes por sítio entre sequências escolhidas aleatoriamente. Medidas de diversidade molecular como diversidade de haplótipos (Hd) e nucleotídica (Pi) foram calculadas utilizando-se o programa DnaSP, versão 4.5 (Rozas *et al.* 2003), bem como número de haplótipos, número médio de diferenças nucleotídicas (k). O conteúdo G+C foi calculado utilizando o programa Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.* 2000).

3.5.2. Testes de Neutralidade

Segundo a teoria neutra de mutações de Kimura (1968) a maior parte das substituições de nucleotídeos que ocorrem nos indivíduos de uma população e são fixadas são neutras em relação ao sucesso reprodutivo (*fitness*) e sobrevivência da espécie. Para testar se a substituição de nucleotídeos seguiu essa teoria foram realizados os teste de D de Tajima (Tajima 1989), F^* e D^* de seletividade neutra (Fu & Li 1993) e F_s de Fu (Fu, 1997) com significância em $p < 0,05$, implementados pelos programas DnaSP, versão 4.5 (Rozas *et al.* 2003) e Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.* 2000).

3.5.3. Análise de Variância Molecular (AMOVA)

A análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada para verificação de populações diferenciadas, analisando seu grau de significância intra e interpopulacional levando em consideração o número de mutações entre haplótipos moleculares. Estes cálculos são baseados na metodologia descrita por Excoffier *et al.* (1992) e estão implementadas no programa Arlequin, ver. 2000 (Schneider *et al.* 2000). As populações são reunidas em grupos previamente definidos, no caso com base em critérios geográficos, onde os resultados baseiam-se em permutações entre os grupos (F_{ct}), depois são obtidos valores para permutação entre populações dentro dos grupos (F_{sc}) e o terceiro passo seria permutação dentro das populações (F_{st}).

3.5.4. Estruturação das populações

A estruturação das populações foi avaliada por meio do número efetivo de migrantes (N_m) e valores de índice de fixação (F_{st}), ambos calculados pelo programa Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.* 2000) através de 3000 permutações paramétricas entre os haplótipos das populações. Estes índices são relacionados, quando considerados dados haplóides, pela seguinte relação $F_{st} = 1/2 N_m + 1$.

3.5.5. Isolamento por distância

O isolamento por distância foi testado através de metodologia desenvolvida por Mantel (1967), implementado no programa IBDWS - Isolation by Distance web service versão 3.16 (ibdws.sdsu.edu/). Este método realiza análise de correlação entre matrizes de similaridade genética e matrizes de distância geográfica. A distância genética (similaridade) foi obtida no programa Arlequin ver. 2000 (Schneider *et al.* 2000) e as distâncias geográficas foram obtidas através de cálculos realizados no programa Google Earth 5.0.

3.5.6. Análises dos haplótipos

O programa TCS versão 1.21 (Clement *et al.* 2000) foi utilizado para inferência do relacionamento genealógico entre os haplótipos. A formação da rede de haplótipos dá-se pela utilização de parcimônia máxima

Para avaliar o relacionamento filogenético entre os haplótipos de *Ae. aegypti* e verificar se estes compõem somente um ou mais agrupamentos foi construído dendrograma de haplótipos baseado em Neighbor-Joining utilizando modelo de distância genética de Tamura-Nei perante 1000 réplicas. Para tal foram utilizadas ferramentas disponibilizadas pelo programa MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.* 2007).

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

As análises foram realizadas a partir de sequências de um fragmento do gene mitocondrial NADH4 desidrogenase de 47 indivíduos provenientes de sete populações do Paraná. Todas as sequências passaram por inspeção visual do posicionamento e confiabilidade das bases ao menos duas vezes antes de serem utilizadas nas análises estatísticas, descartando as que apresentavam baixa qualidade, o que resultou em 26 sequências utilizadas (Anexo I).

As sequências tiveram trezentos e quarenta e três nucleotídeos analisados. Foram utilizados dez indivíduos de Santa Helena, sete de Foz do Iguaçu, dois de Cascavel, dois de Loanda, dois de Maringá, dois de Pato Bragado e um de Ubitatã resultando em nove diferentes haplótipos.

Todos os haplótipos encontrados no presente trabalho tiveram suas sequências submetidas à ferramenta Blast do *GenBank* para confirmação do fragmento amplificado como sendo do organismo estudado, bem como realização de análises de similaridade para detecção de possíveis coincidências com demais haplótipos de NADH4 de *A. aegypti* depositadas no banco de dados.

A frequência relativa dos nove haplótipos distribuídos nas sete populações está ilustrada na figura 7. O haplótipo mais abundante foi o H1 (69,23%), tendo 18 indivíduos distribuídos nas populações de Cascavel (5,5%), Foz do Iguaçu (33,3%), Maringá (5,5%), Santa Helena (44,7%) e Pato Bragado (11%). Os outros oito haplótipos referiram-se à haplótipos *singletons*, ou seja, haplótipos só identificados em um indivíduo estudado (Tabela 3). Quando submetido à análise de similaridade com as sequências já depositadas no *GenBank* não houve similaridade total com nenhuma das sequências, considerando-se similaridade total como coincidência entre os trezentos e quarenta e três pares de bases das sequências estudadas e as que estão depositadas nesse banco de dados.

O grande número de indivíduos distribuídos por diferentes locais do estado pode ser evidência de que esta é uma linhagem há muito tempo estabelecida. O fato de não ocorrer em outros locais do país pode ser devido a terem sido realizadas amostragens insuficientes para detectá-lo ou este ser exclusivo do Paraná, provavelmente tendo sido originado de outro haplótipo ainda mais antigo. Apenas dois dos municípios estudados não apresentaram este haplótipo, Loanda e Ubitatã,

fato que pode estar relacionado com a recente história da presença do vetor e dos casos de dengue nesses municípios.

Os demais haplótipos (oito), todos *singletons*, apresentam-se distribuídos pelos municípios de Santa Helena (dois), Foz do Iguaçu (um), Cascavel (um), Loanda (dois), Maringá (um) e Ubatã (um). Dentre essas seqüências foi verificada coincidência total entre o haplótipo H5 do presente trabalho, que ocorreu em indivíduo proveniente do município de Santa Helena, e H10 do trabalho de Costa *et al.* 2006 (*GenBank* #EF153753). Esse fato evidencia a ligação entre indivíduos do Paraná e de outros locais do país, reforçando o papel do homem como principal transportador da espécie, uma vez que esta não apresenta grande capacidade de dispersão, realizando apenas vôos a pequenas distâncias (Reiter *et al.* 1995). Outras interpretações sobre a movimentação de *A. aegypti* no Paraná poderão receber melhores explicações após publicação em periódico do trabalho de Costa *et al.* 2006, permitindo conhecer os locais onde foram coletados indivíduos com o haplótipo H10 e assim estabelecer relação com a cidade de Santa Helena, município este de grande importância para o Estado do Paraná e também para todo o país por terem sido reportados casos de febre amarela no ano de 2007, mesmo ano em que os espécimes utilizados neste estudo foram coletados.

Uma das possibilidades para presença dos demais haplótipos únicos encontrados pode ser explicada pelo fato de terem ocorrido mutações recentes que tenham se fixado nas populações e/ou indivíduos analisados e que ainda não foram dispersos através das fronteiras dos municípios estudados. Essas mutações em geral acontecem após períodos de expansão populacional seguidos de efeito gargalo de garrafa (*bottleneck*), que são pressões que forçam um abrupto declínio populacional, selecionando alguns indivíduos ou grupos de indivíduos da população que sobrevivem. Assim estes indivíduos tornam-se fonte de diversidade para originar as populações seguintes. Quando se trata de populações de vetores o grande declínio das populações está fortemente relacionado às atividades de controle aplicadas geralmente quando os índices de infestação, muitas vezes realizados com base em pesquisa larvária ultrapassam níveis estabelecidos pelos órgãos oficiais de saúde pública. O índice de infestação predial é parâmetro mais usado. Com valores menores que 1 o índice é considerado satisfatório, entre 1 e 3,9 nível de alerta e maior que 3,9 há risco de surto da doença (SVS/Ministério da Saúde).

Em ações de controle dirigidas aos adultos, indivíduos que causam incômodo de forma direta aos humanos, o declínio populacional é facilmente visível, porém devem-se considerar também as formas imaturas. Assim, quando as ações são dirigidas aos imaturos, ocorre redução de locais para oviposição por ação mecânica (destruindo potenciais criadouros) além da aplicação de produtos químicos larvicidas que causam impacto negativo na geração seguinte de adultos, ao mesmo tempo que fragmenta espacialmente a distribuição do vetor, podendo repercutir na estrutura genética dessas populações.

Tabela III: Localidade de coleta dos indivíduos de *A. aegypti* sequenciados do Estado do Paraná, número de indivíduos utilizados e haplótipos resultantes.

Cidade	N	Haplótipos/quantidade
Foz do Iguaçu	7	H1(6), H3(1)
Santa Helena	10	H1(8), H2 (1), H5 (1)
Cascavel	2	H1(1), H4(1)
Pato Bragado	2	H1(2)
Loanda	2	H6(1), H8(1)
Ubiratã	1	H9(1)
Maringá	2	H1(1), H7(1)

N: número de indivíduos estudados

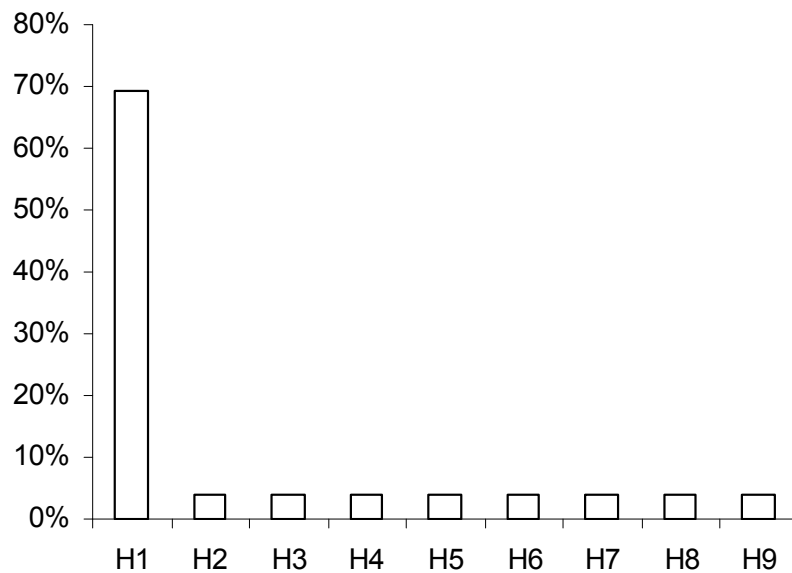


Figura 7: Frequência relativa dos nove haplótipos detectados nas populações de *Aedes aegypti* provenientes de Cascavel, Foz do Iguaçu, Loanda, Maringá, Pato Bragado, Santa Helena e Ubatã, Paraná.

As sequências apresentaram 31 sítios polimórficos (Tabela 4), dos quais 16 foram informativos para parcimônia. A composição de nucleotídeos foi de 9,06% para citosina (C), 42,81% de timina (T), 27,44% de adenina (A) e 20,69% de guanina (G), resultando em conteúdo G+C foi de 29,75%, dentro do esperado para Insecta, que é de aproximadamente 30%.

O número de indivíduos sequenciados (N), o número de haplótipos encontrados (NH), a diversidade de haplótipos (Hd) e a diversidade de nucleotídeos (Pi) têm seus valores ilustrados na Tabela 5. O número médio de diferenças nucleotídicas foi de $K=3,93231$.

Tabela IV: Posição das mudanças nucleotídicas nos nove haplótipos encontrados nas populações de *A. aegypti* do Paraná.

Haplótipo		Posições de mudanças nucleotídicas																												N° indiv/duos																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
		1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Tabela V: Diversidade genética calculada para sete populações de *Aedes aegypti* do Paraná.

População	N	NH	Hd	Pi
Total	26	9	0,529	0,01146
Santa Helena	10	3	0,378	0,00875
Foz do Iguaçu	7	2	0,286	0,00083
Cascavel	2	2	1,000	0,00292
Loanda	2	2	1,000	0,04373
Pato Bragado	2	1	0,000	0,00000
Maringá	2	2	1,000	0,01166

N: número de indivíduos estudados; NH: número de haplótipos encontrados; Hd: diversidade genética; Pi: diversidade nucleotídica. O município de Ubitatã não foi incluída nas análises, pois teve um indivíduo analisado.

A diversidade de haplótipos (Hd) nas populações de *A. aegypti* apresentou valores considerados baixos (Hd = 0,5292) quando comparados com outros trabalhos realizados com a espécie, como 0,66 (Bracco 2004), 0,686 (Costa-da-Silva *et al.* 2005). Também, quando este índice foi calculado para as populações dos municípios separadamente apresentou valores ainda mais baixos, Hd = 0,297 e 0,286 para Santa Helena e Foz do Iguaçu respectivamente, com os demais municípios apresentando valores iguais a um devido a não repetição de haplótipos. Outras espécies de culicídeos apresentam em geral valores baixos de diversidade haplotípica como *Anopheles trinkae* (Hd = 0,599), *A. albimatus* (Hd = 0,0045) e *A. nuneztovari* (Hd = 0,564), porém para *A. darlingi* os valores verificados são altos (Hd = 0,756) (Conn *et al.* 1997, De Mérida *et al.* 1999, Scarpassa *et al.* 2000; Angella 2006). Em comparação com outros trabalhos realizados com NADH4 para *A. aegypti* como os supra citados, os valores aqui apresentados são menores, porém este parâmetro deve ser analisado com bastante cuidado, uma vez que a diversidade haplotípica está relacionada com o tamanho amostral em se tratando de trabalhos que utilizam como fonte de informação sequências de DNA mitocondrial. Por este

fato o uso de valores de diversidade de haplótipos muitas vezes não são sequer mencionados em muitos trabalhos com mtDNA e os valores de diversidade de nucleotídeos (P_i) são os mais indicados para comparação em estudos com DNA mitocondrial. Os altos valores de diversidade haplotípica para as populações de Cascavel, Maringá, Pato Bragado, Loanda e Ubiratã (Tabela 5) podem significar que estas populações passaram recentemente por eventos que causaram declínio da população, como gargalo de garrafa (*bottleneck*). Esses eventos podem ser decorrentes do uso de inseticidas, colonização e recolonização.

A diversidade de nucleotídeos (P_i), que reflete a probabilidade de dois nucleotídeos homólogos, escolhidos ao acaso, serem diferentes em uma população, é um índice muito explorado em trabalhos com mtDNA. O maior emprego da diversidade nucleotídica deve-se ao fato de seus valores não estarem vinculados com o tamanho amostral, como citado para diversidade haplotípica. O valor de diversidade de nucleotídeos foi de 0,01146 quando considerados todos os indivíduos, com valores maiores sendo verificados quando analisadas as populações de maneira separada (Tabela 5). Outros trabalhos realizados com populações brasileiras obtiveram valores de P_i próximos ao do presente trabalho, como Bracco *et al.* (2007), $P_i = 0,01997$ e Lima-Júnior (2007) com $P_i = 0,0113$. Para o Peru (Costa-da-Silva *et al.* 2005) o valor encontrado foi de $P_i = 0,0079$, bem menor que os apresentados pelas populações do Brasil. Dentro de cada município o maior valor de diversidade nucleotídica foi Loanda ($P_i=0,04373$) que aparentemente pode ter sido causado pela detecção de haplótipo único altamente divergente em comparação com os demais encontrados, seguido de Maringá ($P_i=0,01166$). Maringá pode estar apresentando este resultado por ser um grande centro urbano densamente povoado e apresentar grande fluxo de pessoas por ser um dos principais centros comerciais, culturais e educacionais na região onde está inserida.

Os valores dos testes de neutralidade, D de Tajima, D^* e F^* de Fu & Li, e F_s de Fu e Li foram aplicados à todas as populações em conjunto e também às populações, uma a uma, mostraram alguns valores significantes considerando 95% de significância (Tabela 6). Exceto pelo teste D de Tajima, os demais testes estatísticos mostraram que as substituições de nucleotídeos estão ocorrendo de acordo com a teoria neutra de substituição de nucleotídeos proposta por Kimura (1968). O teste F_s de Fu mostra-se como ferramenta promissora na detecção de processos históricos de expansão populacional, pois considera o fator temporal para

classificar as mutações e tem alta sensibilidade para detectar mutações recentes. Quando analisados somente os valores do teste F_s de F_u podemos verificar que as populações aqui estudadas não estão passando por processos de expansão populacional. Isso também é reforçado pelos valores relativamente altos de diversidade nucleotídica, parâmetro que é indicio de declínio ou redução populacional quando em decréscimo. Para as populações como um todo e para a cidade de Santa Helena os valores do D de Tajima mostraram valores significativos (e negativos) que revelam que estariam ocorrendo substituições deletérias nos pares de bases. A tendência geral na evolução é que a seleção natural elimine este tipo de mutação. Assim, as mutações deletérias podem ter sido detectadas tão logo ocorreram, sendo provenientes de haplótipos únicos e que surgiram há pouco tempo nas populações, uma vez que a seleção natural ainda não foi capaz de eliminá-las dessas populações.

Tabela VI: Resultado dos testes de neutralidade de populações de *A. aegypti* do Estado do Paraná.

População	D de Tajima	D^* de F_u & L_i	F^* de F_u & L_i	F_s de F_u
Santa Helena	-1,99996*	-2,35081	-2,083	-0,093
Foz do Iguaçu	-1,00623	-1,04881	-1,10146	-0,095
Cascavel	NC	NC	NC	0
Maringá	NC	NC	NC	1,38629
Loanda	NC	NC	NC	2,70805
Total	-2,09099*	-1,62725	-2,083	-0,093

As análises estatísticas foram realizadas com 95% de significância. * indica valores significativos.

As análises de variância molecular revelaram que a maior fonte de variação genética ocorreu entre populações (56,63%), com valores de F_{st} (0,56631; $P < 10^{-5}$) indicando estruturação das populações. Os valores significativos de F_{st} entre as populações de Santa Helena e Foz do Iguaçu com as demais populações devem ser

fonte desta variação, resultando na estruturação observada (Tabela 7). Um fato interessante é que na maior parte dos estudos realizados no Brasil a maior porcentagem da variação entre os indivíduos estar ocorrendo dentro dos grupos (Bracco *et al.* 2007, Lima-Júnior 2007, Paduan & Ribolla 2008).

Quando realizada a segunda análise de variância molecular, considerando quatro grupos distintos de agrupamento de populações, a maior fonte de variação genética foi encontrada entre as populações dentro dos grupos (68,85%, Fsc: 0,59295, $P < 10^{-5}$) (Tabela 8). Este alto valor de variação entre populações dentro dos grupos pode ser decorrente de valores significativos de Fst de Santa Helena e Foz do Iguaçu que compõem o grupo Oeste (já evidenciado na primeira AMOVA), formado por mais duas populações (Cascavel e Pato Bragado) além das já citadas. Os demais grupos são, cada um, formados por apenas uma população, assim reforçando o papel da mesorregião Oeste como grupo com grande variabilidade genética dentre os indivíduos estudados.

Quanto à mesorregião Oeste, podemos destacar seu papel importante por apresentar área de contato e grande fluxo de pessoas e mercadorias devido à presença da tríplice fronteira entre Brasil, Paraguai e Argentina, representada pela cidade de Foz do Iguaçu. Essa cidade, além de ser local de trânsito de mercadorias e pessoas entre os países, também recebe turistas de diversas partes do mundo interessados em conhecer o Parque Nacional do Iguaçu e as Cataratas do rio Iguaçu. Santa Helena também se encontra em limites territoriais do Paraná com o Paraguai, apresentando também considerável fluxo de pessoas. Importante acrescentar que ambas cidades são banhadas pelo rio Paraná, por onde *Aedes aegypti* pode estar sendo disperso através de transporte náutico, comum na região.

Tabela VII: Análise de variância molecular (AMOVA) considerando todas as populações de *Aedes aegypti* consideradas no Paraná em um único grupo.

Tipo de variação	GL	CV	% de variação	Índice de fixação
Entre populações	6	6,751	56,63	Fst = 0,56631
Dentro de populações	19	4,057	43,37	

P < 10⁻⁵

Tabela VIII: Análise de variância molecular (AMOVA) considerando as populações de *Aedes aegypti* do Estado do Paraná de maneira separada, em agrupamentos por mesorregiões.

Tipo de Variação	GL	CV	% de Variação	Índice de Fixação
Entre populações	3	-0,07278	-16,11	-0,16108 ^a
Entre populações dentro dos grupos	3	0,31108	68,85	0,59297 ^b
Dentro das populações	19	0,21353	47,26	0,52741 ^b

^a P significativo; ^b P < 10⁻⁵

A diferenciação genética entre as sete populações estudadas foi analisada levando em consideração os valores par a par de *Fst* e também pelo número efetivo de migrantes (*Nm*) entre as populações, cujos valores são disponibilizados nas tabelas 09 e 10. Os resultados mostram valores significativos de *Fst* ($P < 0,00238$) após a correção de Bonferroni (Rice, 1989), em comparações principalmente envolvendo os municípios de Santa Helena e Foz do Iguaçu.

Os valores de número de migrantes por geração (*Nm*), calculados a partir dos valores de *Fst* par a par, revelam valores significativos de troca de indivíduos entre algumas populações. Estas trocas ocorreram em especial entre Santa Helena e Foz do Iguaçu com as demais populações, exceto Loanda, que apresentou apenas um haplótipo singleton, ressaltando a ausência da relação entre as distâncias genéticas e geográficas entre as populações. A presença de maiores quantidades de indivíduos do haplótipo H1 pode estar levando a esta situação de fluxo gênico não relacionado com a distância geográfica.

Os valores de número de migrantes mostram-se baixos quando comparadas com outros trabalhos, como por exemplo, Lima-Júnior (2007), que calculou mais de três dezenas de migrantes por geração entre localidades, indicando que as populações aqui estudadas encontram-se estruturadas. Vale ressaltar que em Lima-Júnior (2007) a amostragem mostrou-se uniforme entre as localidades amostradas e também foram encontrados valores menores de número de migrantes entre alguns pares. Esta situação pode estar acontecendo por vários motivos, porém o que pode ser muito interessante nesta situação é que a migração de pessoas e mercadorias por via rodoviária não está sendo fonte de colonização e recolonização de *A. aegypti* nos municípios, o que é um fato positivo para o controle da espécie. Outra explicação para tal estruturação é a de que as populações de *Aedes aegypti* estão sendo mantidas, ainda que em pequeno número de indivíduos, mesmo com ações de controle realizados pelo órgãos oficiais do Estado. Recentemente, Prophiro (2008) revelou uma menor susceptibilidade de *A. aegypti* ao temefós no município de Foz do Iguaçu, dando subsídios à hipótese de que as populações não estão sendo eliminadas em sua totalidade apesar da aplicação de inseticidas.

O isolamento por distância, definido pela diminuição da similaridade entre populações à medida que a distância geográfica entre elas aumenta, foi testado através de metodologia desenvolvida por Mantel. Esta análise revelou que as populações não apresentaram valor significativo para correlação ($R = -0,0659$; $P =$

0,5770) entre as distâncias genéticas dos indivíduos e a distância geográfica entre as cidades onde estes indivíduos foram coletados (Figura 8).

Quando submetidas à mesma metodologia as populações que compõe a mesorregião Oeste (Foz do Iguaçu, Santa Helena, Cascavel e Pato Bragado) o valor para correlação entre as distâncias também não apresentou valor significativo ($R = -0,2027$; $p = 0,5420$) (Figura 9).

O isolamento por distância pode estar diretamente relacionado com o movimento humano, aumentando a similaridade genética entre populações geograficamente distantes (Wright 1943). Estudos realizados no México corroboram esta teoria, sugerindo que o fluxo gênico entre as populações de *Aedes aegypti* do país diminui com o aumento da distância geográfica (Gorrochotegui-Escalante *et al.* 2002). Paduan & Ribolla (2008), porém obtiveram dados que revelaram populações não isoladas por distância. Do mesmo modo, os dados aqui obtidos não encontraram qualquer relacionamento entre distâncias geográficas e genética. Assim pode-se inferir que a distância não está se mostrando como fator determinante no isolamento detectado para as populações paranaenses, talvez por, na maior parte das vezes, a migração de *A. aegypti* estar relacionada muito mais a movimentos antrópicos (que não originam padrão) do que por movimentos do vetor. Uma maior amostragem nestas e em outras cidades do Paraná também podem ter grande valor para elucidar este quadro.

Tabela IX: Valores de F_{st} par a par para populações de *Aedes aegypti* das cidades estudadas no Estado do Paraná

	SH	FI	C	M	PB	L	U
FI	0,66145*						
C	0,50450*	0,56465*					
M	0,50450*	0,56465*	0,00000	0,00000			
PB	0,68165	0,76536*	0,50000	0,50000	0,00000		
L	0,50450*	0,56465*	0,00000	0,00000	0,50000	0,00000	
U	0,62222	0,71429	0,00000	0,00000	1,00000	0,00000	0,00000

SH – Santa Helena; FI – Foz do Iguaçu, C – Cascavel; M – Maringá; PB – Pato Bragado; L – Loanda; U – Ubiratã. * valores significativos após correção de Bonferroni.

Tabela X: Valores de Nm (número efetivo de migrantes) entre indivíduos provenientes das populações de *Aedes aegypti* das sete cidades paranaenses estudadas.

	SH	FI	C	M	PB	L
FI	0,25591					
C	0,49107	0,38551				
M	0,49107	0,38551	inf			
PB	0,23352	0,15328	0,50000	0,50000		
L	0,49107	0,38551	inf	inf	0,50000	
U	0,30357	0,20000	inf	inf	0,00000	inf

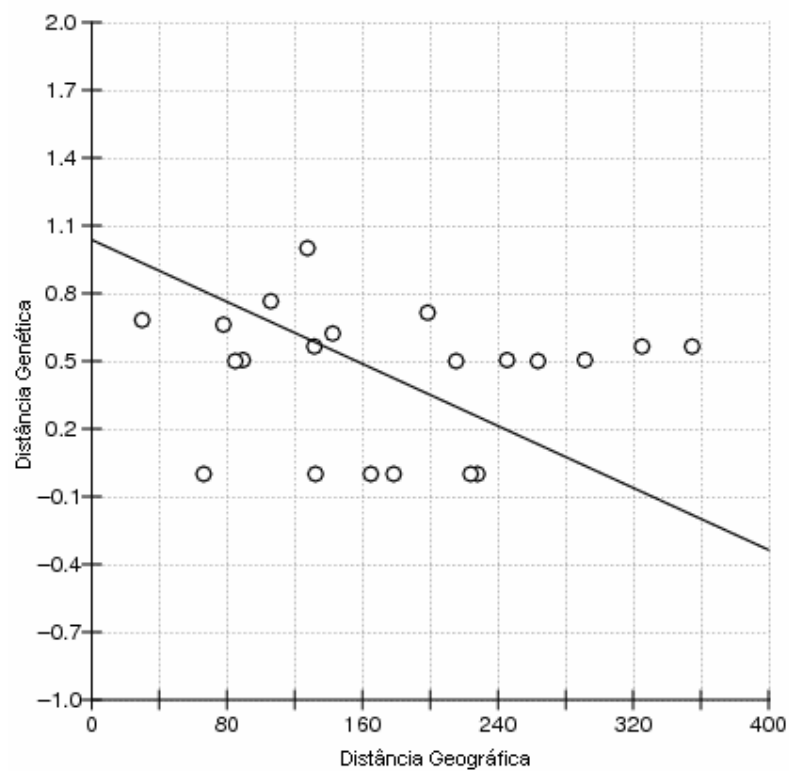


Figura 8: Gráfico de regressão de Mantel para as populações de *Aedes aegypti* com uso de *Fst* par a par. $R=-0,0659$; $p=0,5770$.

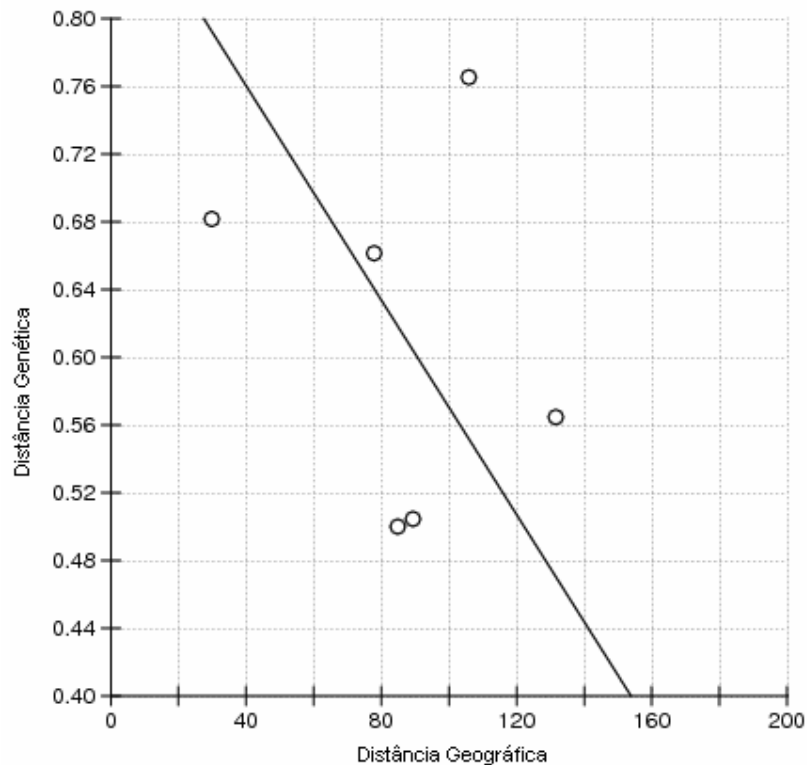


Figura 9: Gráfico de regressão de Mantel para as populações de mesorregião Oeste de *Aedes aegypti* com uso de F_{st} par a par. $R=-0,2027$; $p=0,5420$.

Um dendrograma baseado nas sequências dos haplótipos foi gerado utilizando-se o programa Mega versão 4.0 (Figura 10). As sequências de cada um dos nove haplótipos foram utilizadas para a realização do mesmo. O resultado revelou a formação de dois clados distintos com os haplótipos encontrados, um contendo os haplótipos H5 e H6 (Santa Helena e Loanda) e os outros com todos os demais haplótipos em concordância com os dados obtidos para populações já estudadas de *A. aegypti* em território nacional (Lima-Júnior 2007; Bracco *et al.* 2007) que também utilizaram como ferramenta o gene mitocondrial NADH4.

Com base no método de parcimônia máxima foi construída uma rede de haplótipos no programa TCS (Figura 11), onde as elipses e quadrados são proporcionais ao número de indivíduos pertencentes a cada haplótipo. Este resultado reforçou os resultados obtidos pelo dendrograma, pois a rede de haplótipos mostrou os haplótipos H5 e H6 como sendo os mais distantes dos demais, com maior número de mutações em relação ao provável haplótipo ancestral H1 (com maior número de indivíduos). Este fato vem sendo atribuído à presença de duas subespécies no continente africano: *Aedes aegypti aegypti* e *Aedes aegypti formosus*, proposto por Tabachick & Powell (1978). Valores de relógio molecular calculados no trabalho de Bracco (2004) indicam que estas duas subespécies separaram-se há 35 milhões de anos. Powell & Tabachick (1980) apresentam a proposição de que a espécie que inicialmente colonizou as Américas e Caribe nos séculos XVII e XVIII foi *Aedes aegypti aegypti*, e então posteriormente teria havido a entrada de *Aedes aegypti formosus* nesta região. Mais estudos, em escala mundial, são necessários para gerar maiores subsídios no sentido de elucidar a possibilidade de haver duas linhagens mitocondriais distintas de *Aedes aegypti*.

Diante destes resultados pode-se levantar a hipótese de que as populações de *A. aegypti* estudadas no Estado do Paraná apresentam duas linhagens mitocondriais. A presença de linhagens diferenciadas de *Aedes aegypti* possui implicações na epidemiologia da dengue. Failloux *et al.* (2002) indicaram a detecção de diferentes taxas de infecção pelo sorotipo DEN-2 entre as subespécies. Deste modo, *Aedes aegypti aegypti* apresenta taxas de infecção mais altas quando comparadas com *Aedes aegypti formosus*. Também estudos realizados sem considerar subespécies evidenciam variações na competência vetora no México e Estados Unidos ao considerar o mesmo sorotipo de dengue (Bennett *et al.* 2002).

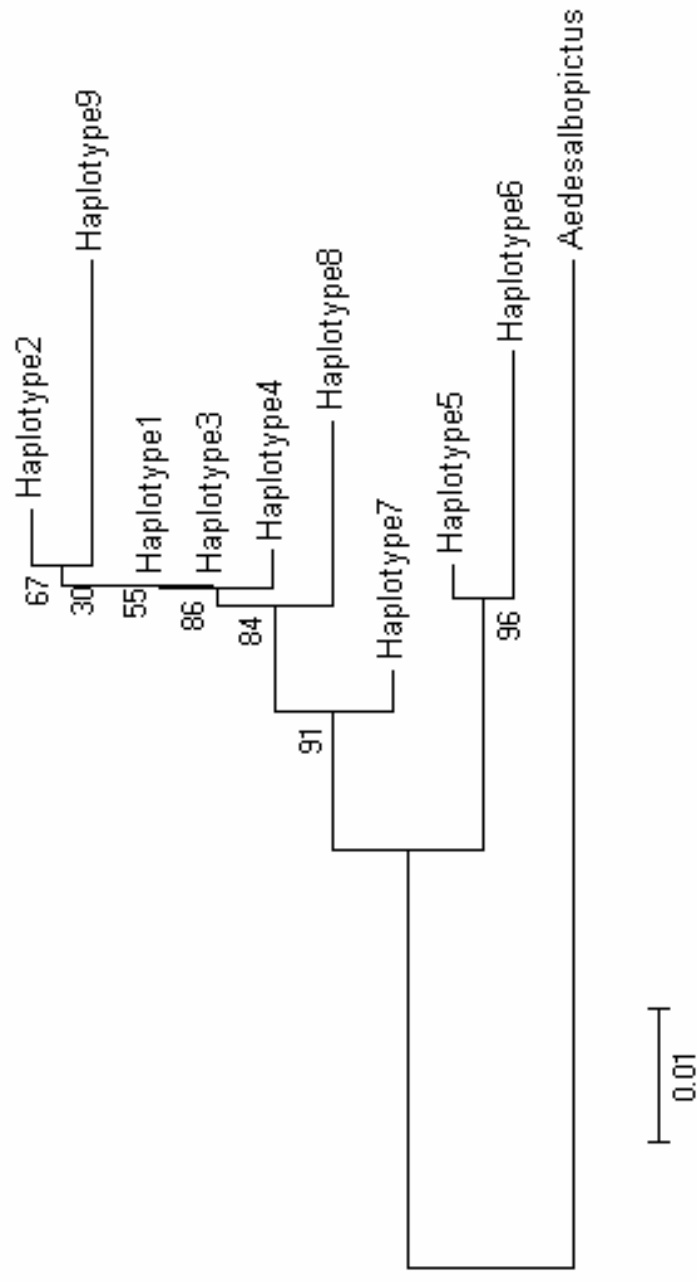


Figura 10: Dendrograma dos nove haplótipos de *Aedes aegypti* utilizando o método de Neighbor-Joining (modelo de distância genética de Tamura-Nei), com inclusão de *A. albopictus* como grupo externo. Os valores de bootstrap encontram-se nos ramos.

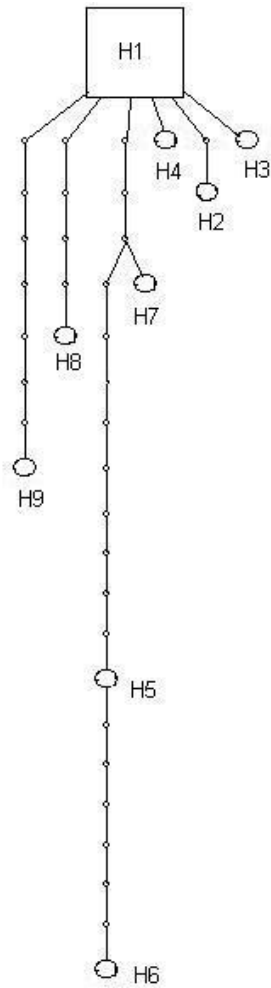


Figura 11: Rede de haplótipos com base no método de parcimônia máxima construída no programa TCS.

5. CONCLUSÕES

Foram encontrados nove haplótipos diferentes nas sete populações paranaenses investigadas no presente estudo.

Destes haplótipos, oito foram *singletons* e apenas um foi detectado em mais de um indivíduo e população, ocorrendo em Cascavel, Foz do Iguaçu, Maringá, Pato Bragado e Santa Helena.

Os resultados dos testes de neutralidade realizados indicam que as populações paranaenses de *A. aegypti* não estão passando por processos de modificação de tamanho populacional e que algumas mutações são deletérias, podendo indicar que estas ocorreram recentemente ao passo que ainda não puderam ser eliminadas por seleção natural.

As populações estudadas encontram-se estruturadas, com grande variedade de haplótipos *singletons* e valores muito baixos de troca de indivíduos por geração.

O fluxo gênico ocorre em maior proporção entre Foz do Iguaçu e Santa Helena entre si e com as outras localidades, com valores significativos de *F_{st}* par a par, mostrando estas como as populações menos estruturadas.

Não há correlação entre a distância geográfica entre as populações analisadas e a distância genética entre estas.

É provável que duas linhagens diferentes de *A. aegypti* tenham sido introduzidas no Paraná, evidenciado pela presença de dois grupos distintos no dendrograma gerado para os haplótipos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGÊLLA, A. L. Estudo populacional de *Anopheles darlingi* utilizando análise de RAPD e sequenciamento de genes mitocondriais. 100 f. **Dissertação (Programa de Pós-graduação em Genética)**. Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2006.

AYRES, C. F. J.; MELO-SANTOS,; SOLÉ-CAVA, A. M.; FURTADO, A. F. 2003. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the major dengue vector in Brazil. **Journal of Medical Entomology** 40(4): 430-435.

BENNETT, K. E.; OLSON, K. E.; MUNÓZ MDE, L.; FERNANDEZ-SALAS, I.; FARFAN-ALE, J. A. HIGGS, S.; BLACK, W.C.; BEATY, B. J. 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections from Mexico and the United States. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 67(1): 85-92.

BOORE, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. **Nucleic Acids Research** 27(8): 1767-1780.

BOSIO, C. F.; FULTON, R. E.; SALASEK, M. L.; BEATY, B. J.; BLACK IV, W. C. 2000. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics** 156: 687-698.

BRACCO, J. E.; CAPURRO, M. L.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA. R; SALLUM, M. A. M. 2007. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 102(5): 573-580.

BRACCO, J. E. Genealogia, distribuição e história de haplótipos do gene mitocondrial NADH4 em populações *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) no Brasil. 111 f. **Tese (Programa de Pós-graduação em Saúde Pública)**. Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

CÂMARA, F. P.; THEOPHILO, R. L. G.; SANTOS, G. T.; PEREIRA S. R. F. G.; CÂMARA, D. C. P.; MATOS, R. R. C. 2007. Estudo retrospectivo (histórico) da dengue no Brasil: características regionais e dinâmicas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **40**(2): 192-196.

CALDERÓN-ARGUEDAS, O.; TROYO, A.; SOLANO, M. E. 2004. Diversidad larval de mosquitos (Diptera: Culicidae) en contenedores artificiales procedentes de una comunidad urbana de San José, Costa Rica. **Parasitol Latinoam** **59**: 132-136.

Center of Disease Control (CDC). Disponível em: <<http://wonder.cdc.gov/wonder/PrevGuid/p0000434/p0000434.asp>> Acesso em 15/06/2008.

CANYON, D. V.; HILL, J. L. K.; MULLER, R. 1999. Adaptation of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) oviposition behaviour to humidity and diet. **Journal of Insect Physiology** **45**: 959-964.

CHAREONVIRIYAPHAP, T.; LERDTHUSNEE, K. 2002. Genetic differentiation of *Aedes aegypti* and island populations from Southern Thailand. **Journal of the American Mosquito Control Association** **18**(3): 173-177.

CHEUNG, W. Y.; HUBERT, N. & LAUNDRY, B. S. 1993. A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analyses. **PCR Methods and Applications** **3**: 69-70.

CHIARAVALLOTI-NETO, F. 1997. Descrição da colonização de *Aedes aegypti* na região de São José do Rio Preto, São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **30**(4): 279-285.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDAL, K. A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology** **9**(10): 1657-1660.

CONN, J. E.; MITCHELL, S. E. COCKBURN, A. F. 1997. Mitochondrial DNA variation within and between tow species of neotropical anopheline mosquitoes (Diptera: Culicidae). **Journal of heredity** **88**:98107.

CONSOLI, R. A. G. B. & LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 1994. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 228p.

COSTA, M. C. V., PADUAN, K. S., RIBOLLA, P. E. M., LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 2006. *Aedes aegypti* haplotype 10 NADH4 desidrogenase subunit 4 (ND4) gene, partial cds; mitochondrial. EF153753. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/119721158>, Dec 2006.

COSTA-DA-SILVA, A. L.; CAPURRO, M. L.; BRACCO, J. E. 2005. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **100**(6): 639-644.

COSTA-RIBEIRO, M. C. V.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; FAILLOUX, A. B. 2006. Higher genetic variation estimated by microsatellites compared to isoenzyme markers in *Aedes aegypti* from Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **101**(8): 917-921.

DE MÉRIDA, A. A. P.; PALMIERI, M.; YURRITA, M. M.; MOLINA, A.; MOLINA, E.; BLACK IV, W. C. 1999. Mitochondrial DNA variation among *Anopheles albimanus* populations. **American Journal of Medicine and Hygiene** **61**(2): 230-239.

DIBO, M. R.; CHIARAVALLOTI-NETO, F.; BATTIGAGLIA, M.; MONDINI, A.; FAVARO, E. A.; BARBOSA, A. A. C.; GLASSER, C. M. 2005. Identification of the best ovitrap installation sites for gravid *Aedes (Stegomyia) aegypti* in residences in Mirassol, state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** **100**(4): 339-343.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** **131**: 479-491.

FAILLOUX, A. B.; VAZEILLE, M.; RODHAIN, F. 2002. Geographic genetic variation in population of dengue virus vector *Aedes aegypti*. **Journal of Molecular Evolution** **55**: 653-663.

FORATTINI, O. P. 2002. **Culicidologia Médica**. São Paulo: EDUSP, 864p.

FORRATINI, O. P.; MARQUES, G. R. A. M. 2000. Nota sobre o encontro de *Aedes aegypti* em bromélias. **Revista de Saúde Pública** **34**(5): 543-544.

FRANÇA, G. S. Sequenciamento e análise da região ITS2 de *Anopheles (Kerteszia) cruzii* Dyar & Knab 1908 (Diptera: Culicidae) provenientes da população da Floresta Estadual do Palmito – Paranaguá – PR. 37 f. **Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas)**. Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

FU, Y. X.; LI, W. H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. **Genetics** **133**: 693-709.

FU, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics** **147**: 915-925.

Fundação Nacional de Saúde – FUNASA 1999. Boletim Epidemiológico – Evolução temporal das doenças de notificação compulsória no Brasil de 1980 a 1998.

GARCÍA-FRANCO, F.; MUÑOZ, M. L.; LOZANO-FUENTES, S.; FERNANDEZ-SALAS, I.; GARCIA-REJON, J.; BEATY, B. J.; BLACK IV, W. C. 2002. Large genetic distances among *Aedes aegypti* population along the south pacific coast of Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **6**(5): 594-598.

GOMES, A. C.; SOUZA, J. M. P.; BERGAMASCHI, D.; SANTOS, J. L. F.; ANDRADE, V. R.; LEITE, O. F.; RANGEL, O.; SOUZA, S. S. L.; GUIMARÃES, N. S. N.; LIMA, V. C. L. 2005. Atividade antropofílica de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* em área sob controle e vigilância. **Revista de Saúde Pública** **39**: 206-210.

GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, M.; MUNOZ, M. L.; FERNANDEZ-SALAS, I.; BEATY, B. J. BLACK IV, W. C. 2000. Genetic isolation by distance among *Aedes aegypti* populations along northeastern coast of Mexico. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** **62**(2): 200-209.

GORROCHOTEGUI-ESCALANTE, N.; GÓMEZ-MACHORRO, C.; LOZANO-FUENTES, S.; FERNANDEZ-SALAS, I.; MUNOZ, M. L.; FARFAN-ALE, J. A.; GARCIA-REJON, J.; BEATY, B. J.; BLACK IV, W. C. 2002. Breeding structure of *Aedes aegypti* populations in México varies by region. **American Journal of Medicine and Hygiene** **66**(2): 213-222.

GUBLER, D. J. 2002. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of Medical Research** **33**: 330-342.

HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** **41**: 95-98.

HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. 2001. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Journal of Medical Entomology** **38**(3): 411-422.

HIEN, D. S. 1975. Biology of *Aedes aegypti* (L., 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1895) (Diptera, Culicidae). III. Effect of certain environmental conditions on the development of larvae and pupae. **Acta Parasitologica Polonica** **23**(46): 553-568.

HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. 2003. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Genetics, Infection and Evolution** **3**: 19-28.

HUBER, K.; LOAN, L. L.; HOANG, T. H.; TIEN, T. K.; RODHAIN, F.; FAILLOUX, A-B. 2002. Temporal genetic variation in *Aedes aegypti* populations in Ho Chi Minh City (Vietnam). **Heredity** **89**: 7-14.

KIMURA, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature** **217**(17): 624-626.

LIMA-CAMARA, T. N.; HONÓRIO, N. A. LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. 2006. Frequência e distribuição espacial de *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) no Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública* **22** (10): 2079-2084.

LIMA-JÚNIOR, R. S. Estimativas de variação genética do gene ND4 do DNA mitocondrial de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) da Amazonia brasileira. 80 f. **Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais)**. Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2007.

LOPES, J.; SILVA, M. A. N.; BORSATO, A. M.; OLIVEIRA, V. D. R. B.; OLIVEIRA, F. J. A. 1993. *Aedes (Stegomyia) aegypti* e a culicídeofauna associada em área urbana da região sul, Brasil. **Revista de Saúde Pública**. **27**(5) 326-333.

MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Research** **27**: 209-220.

MATIOLLI, S. R. 2001. **Biologia Molecular e Evolução**. 1ª edição. Editora Holos. Ribeirão Preto – SP, 202p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=22207.> Acesso em 07/10/2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_maio2008.pdf Acesso em 07/10/2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/liraa_relatório.pdf>
Acesso em 01/03/2008.

MONCAYO, A. C.; FERNANDEZ, Z.; ORTIZ, D.; DIALLO, M.; SALL, A.; HARTMAN, S.; DAVIS, C. T.; COFFEY, L.; MATHIOT, C. C.; TESH, R. B.; WEAVER, S. C. 2004. Dengue emergence and adaptation to peridomestic mosquitoes. **Emerging Infectious Diseases** **10**(10): 1790-1796.

NAVARRO, D. M. A. F.; OLIVEIRA, P. E. S.; POTTING, R. P. J.; BRITO, A. C.; FITAL, S. J. F.; GOULART SANT'ANA, A. E. 2003. The potential attractant or repellent effects of different water types on oviposition in *Aedes aegypti* L. (Dipt.: Culicidae). **Journal of Applied Entomology** **127**: 46-50.

PADUAN, K. S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. P.; RIBOLLA, E. M. 2006. Genetic variability in geographical populations of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) in Brazil elucidated by molecular markers. **Genetics and Molecular Biology** **29**(2): 391-395.

PADUAN, K. S.; RIBOLLA, P. E. M. 2008. Mitochondrial DNA Polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. **Journal of Medical Entomology** **45**(1): 59-67.

PAUPY, C.; CHANTHA, N.; HUBER, K.; LECOZ, N.; REYNES, J-M.; RODHAIN, F.; FAILLOUX, A-B. 2004. Influence of breeding sites features on genetic differentiation of *Aedes aegypti* analyzed on a local scale in Phnom Pehn municipality of Cambodia. **American Journal of Medicine and Hygiene** **71**(1): 73-81.

PAUPY, C.; CHANTHA, N.; REYNES, J-M.; FAILLOUX, A-B. 2005. Factors influencing the population structure of *Aedes aegypti* from the main cities in Cambodia. **Heredity** **95**: 144-149.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. 1980. Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study. **Science** **208**(20): 1385-1387.

PROPHIRO, J. S. Análise da susceptibilidade de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera: Culicidae) a organofosforado e alternativa de controle de imaturos do vetor *Aedes aegypti* utilizando produtos de origem botânica. 120f. **Dissertação (Programa de Pós-graduação em Entomologia)**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2008.

RAI, K S. 1999. Genetics of mosquitoes. *Journal of Genetics* 78(3): 163-169.

REITER, P.; AMADOR, M. A.; ANDERSON, R. A.; CLARK, G. C. 1995. Short report: dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood feeding as demonstrated by rubidium-marked egg. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 52: 177-179.

RICE, W. R. 1989. Analysing Tables of Statistical Tests. **Evolution** 43 (1): 223-225.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics** 19(18): 2496-2497.]

RONCAGLIO C, NEUERT M, BORGES MARTINS MA. 2001. Notes for a history of health: document sources of Parana. **História, Ciências, Saúde** 8(1):223-35.

SANTOS, V. M.; MACORIS, M. L. G.; ANDRIGHETTI, M. T. M.; ÁVILA, P. E.; KIRCHGATTER, K. 2003. Analysis of genetic relatedness between populations of *Aedes aegypti* from different geographic regions of São Paulo State, Brazil. 2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 45(2):99-101.

SCARPASSA, V. M. GEURGAS, S.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.;TADEI, W. P. 2000. Genetic divergence in mitochondrial DNA of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) in Brazil and Colombia. **Genetics and Molecular Biology** 23(1): 71-78.

SCHNEIDER, S.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. 2000. **Arlequin ver. 2000: A software for population genetics data analyses**. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva. Switzerland.

SILVA, V. C.; SCHERER, P. O.; FALCÃO, S. S.; ALENCAR, J.; CUNHA, S. P.; RODRIGUES, I. M.; PINHEIRO, N. L. 2006. Diversidade de criadouros e tipos de imóveis frequentados por *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*. **Revista de Saúde Pública** **40**(6): 1106-1111.

SOUSA, G. B.; BLANCO, A.; GARDENAL, C. N. 2001. Genetic relationships among *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from Argentina using random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction markers. **Journal of Medical Entomology** **38**(3): 371-375.

SU, Y-C.; CHANG, C-Y.; HSU, E-L.; YIN, C-M.; HO, C-M. 2003. Genetic relationships among populations of *Aedes aegypti* in Taiwan by using phenotypic and random amplified DNA-polymerase chain reaction markers. **Journal of the American Mosquito Control Association** **19**(4): 329-338.

TABACHNICK, W. J.; POWELL, J. L. 1978. Genetic structure of the east African domestic populations of *Aedes aegypti*. **Nature** **272**(6): 535-537.

TAJIMA, F. 1989. Statistical Method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics** **123**: 585-595.

TAMURA, K. DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. 2007. Mega4: Molecular Evolutionary Genetics Analyses (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution** **24**: 1596-1599.

TAUIL, P. L. 2002. Aspectos críticos do controle do dengue no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. **18**(3): 867-871.

TEIXEIRA, M G; BARRETO, M L; GUERRA, Z. 1999. Epidemiologia e medidas de prevenção do dengue. **Informe Epidemiológico do SUS** **8**(4): 5-33.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F. HIGGINS, D. G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research** **25**: 4876-4882.

WRIGHT, S. 1943. Isolation by Distance. **Genetics** **28**: 114-138.

ZAHIRI, N.; RAU, M. E. 1998. Oviposition attraction and repellency of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to waters from conspecific larvae subjected to crowding, confinement, starvation, or infection. **Journal of Medical Entomology** **35**(5): 782-787.

ANEXO I

Sequências de NADH4 de *Aedes aegypti* do Estado do Paraná

	125	135	145	155	165	175
Haplótipo1	TGAAATTTAA	TTATATTTGA	ATCAGTATTA	GTTTAAATTGG	AGGAGTTTTA	GTTAGTTTAA
Haplótipo2
Haplótipo3
Haplótipo4
Haplótipo5	A
Haplótipo6	A
Haplótipo7	A
Haplótipo8
Haplótipo9

	185	195	205	215	225	235
Haplótipo1	TTTGTTTATG	ACAAATAGAT	TTAAAGGCTT	TAA TTGCTTA	TTCTTCGGTT	GCTCATATAG
Haplótipo2
Haplótipo3
Haplótipo4
Haplótipo5
Haplótipo6
Haplótipo7
Haplótipo8
Haplótipo9

Haplotype	305	315	325	335
Haplótipo01	TAATAATTC	TCATGGTTA	TGCTCTTCTG	GGTTATTTTG
Haplótipo02	TAATAATTC	TCATGGTTA	TGCTCTTCTG	GGTTATTTTG
Haplótipo03	TAATAATTC	TCATGGTTA	TGCTCTTCTG	GGTTATTTTG
Haplótipo04	TAATAATTC	TCATGGTTA	TGCTCTTCTG	GGTTATTTTG
Haplótipo05	TAATAATTC	TCATGGTTA	TGCTCTTCTG	GGTTATTTTG
Haplótipo06	TAATAATTC	TCATGGTTA	TGCTCTTCTG	GGTTATTTTG
Haplótipo07	TAATAATTC	TCATGGTTA	TGCTCTTCTG	GGTTATTTTG
Haplótipo08	TAATAATTC	TCATGGTTA	TGCTCTTCTG	GGTTATTTTG
Haplótipo09	CC	CC	CC	CC